

N° d'ordre : 2543

THESE

présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : SEVAB

Spécialité : Qualité et Sécurité des Aliments

Par

Haifaa AL-SAYEDA

Transfert d'un insecticide systémique, l'imidaclopride, chez la tomate : implication du transport phloémien

Soutenue le 15 novembre 2007 devant le jury composé de :

Thierry LAMAZE

Président

François LAURENT

Directeur de thèse

Maria Louisa FERNANDEZ CRUZ

Rapporteur

Patrick RAVANEL

Rapporteur

François LAURENT

Examineur

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Jacques Tulliez et à Monsieur Jean-Pierre Cravedi pour m'avoir accueillie dans l'UMR des Xénobiotiques ainsi que pour leur soutien tout au long de ce travail.

Je remercie Madame Maria Louisa Fernandez Cruz et Monsieur Patrick Ravanel d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse et Monsieur Thierry Lamaze et Monsieur François Laurent d'avoir accepté d'être examinateurs de mon travail de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur François Laurent, mon directeur de thèse de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un tel sujet et pour sa confiance en moi au travail, ses précieux conseils et son soutien.

Je remercie Madame Sophie Lorber pour son soutien et son aide, particulièrement lors de la rédaction.

Je remercie Madame Estelle Rathahao et Monsieur Laurent Debrauwer pour la réalisation des différentes analyses en spectrométrie de masse et leurs explications avisées.

Un grand merci à l'ensemble de mes collègues de l'UMR des Xénobiotiques, en particulier Roselyne, Sabrina, Bérengère et Chary, pour l'aide et la sympathie qu'ils m'ont témoignées durant ces quelques années passées ensemble.

Je remercie vivement le Chef du Département de la protection des plantes de la Faculté du Génie Agricole de l'Université de Damas et le Ministre des Etudes Supérieures pour leur confiance et pour le financement de ma thèse.

Je remercie Monsieur Mohamad Jamal al Hajjar de m'avoir permis d'effectuer mes études en France.

Un grand merci à tous les professeurs du Département de la Protection des Plantes, auxquels je dois ma formation. Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Houda Kawa pour son soutien. Je remercie vivement l'ensemble du personnel de ce Département pour leur sympathie.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à ma mère et à mon père pour la confiance qu'ils me témoignent depuis toujours et pour leurs encouragements.

Je remercie infiniment mes sœurs Bashirah, Wafaa, Rajaa, et mes frères Nemer, Mohammad, Ahmad, Mahmoud et Maher et aussi leurs enfants pour leur grand amour.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon fiancé Saleh, pour son amour et sa patience.

Enfin, je remercie mes amies de Syrie, Safaa, Nadya, Bouthena et Mervat pour leur soutien ainsi que tous les amis que j'ai connues à Toulouse et à Nancy pour leur sympathie et leurs encouragements.

PUBLICATION DANS UNE REVUE INTERNATIONALE A COMITE DE LECTURE

Haifaa AL-SAYEDA, Sophie PASCAL-LORBER, Chary NALLANTHIGAL, Laurent DEBRAUWER, François LAURENT. Fate of [¹⁴C] imidacloprid in tomato plants after soil treatment. *Environ Chem Lett*, DOI 10.1007/s10311-007-0121-2.

POSTERS PRESENTES DANS DES COLLOQUES

Haifaa ALSAYEDA, Sophie PASCAL-LORBER, Jean-Philippe BESSE, François LAURENT (poster). Uptake by edible plants of 4-n-Nonyl-phenol and Diuron from various types of sludge used as soil improvement. SETAC, The Hague (Netherland), **7-11 May 2006**.

Haifaa ALSAYEDA, Sophie PASCAL-LORBER, François LAURENT (communication orale). Transfert des résidus de pesticides vers les fruits : étude d'un modèle, l'imidaclopride, chez la tomate. XXXVI GFP, Strasbourg, **29-31 mai 2006**.

ABREVIATIONS

2,4-D	:	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
6-CAN	:	acide 6-chloronicotinique
ARfD	:	acute reference dose, dose aiguë de référence
ARTAC	:	Association pour la Recherche Thérapeutique Anticancéreuse
CL50	:	concentration létale 50, utilisée pour la concentration d'une substance toxique létale pour la moitié des animaux exposés
Cyt P-450	:	enzyme à cytochrome P-450
DDT	:	dichlorodiphényltrichloroéthane
DG SANCO	:	Direction Générale « santé et protection des consommateurs »
DGCCRF	:	Direction Générale de la Concurrence de la Consommation et de la répression des fraudes
DJA	:	dose journalière admissible
EPA	:	Environmental Protection Agency
FAD	:	flavine adénine dinucléotide
FMN	:	flavine mononucléotide
H'	:	constante de la loi de Henry
INSERM	:	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
JMPR	:	joint meeting on pesticide residues
K _d	:	adsorption d'un composé sur la matière organique
K _{om}	:	adsorption sur la matière organique
K _{ow}	:	coefficient de partage octanol/eau
LD50	:	dose létale 50, désigne la dose entraînant la mort de 50% de la population examinée
LMR	:	limite maximale de résidus
M01 (WAK 4103)	:	composé 5-hydroxy
M06 (WAK 3745)	:	oléfine
M09 (WAK 4140)	:	composé dénitré
MSA	:	Mutualité Sociale Agricole
NAD	:	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NOEL	:	no observed effect level, ou dose sans effet

OCP	:	pesticides organochlorés
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
Pa	:	pascal, unité internationale de mesure de pression
pKa	:	pH auquel 50% des groupes d'un acide ou d'une base sont ionisés
POP	:	produit organique persistant
RCF	:	facteur de concentration dans les racines
TCPY	:	3,5,6-trichloro-2-pyridinol
Tm	:	point de fusion en degré Celsius
TRR	:	taux de radioactivité résiduel
TSCF	:	facteur de concentration dans le flux de transpiration
VP	:	pression de vapeur
WS	:	solubilité dans l'eau

LISTE DES FIGURES

Chapitre I INTRODUCTION

- Figure I-1.** Propriétés physico-chimiques des acides faibles et des composés non ionisés pour différents types de comportement systémique (d'après Bromilow, R. H. et Chamberlain, K., 1989).
- Figure I-2.** Schéma d'une coupe transversale de racine de blé montrant les voies possibles du mouvement de l'eau et des composés solubles (d'après Trapp, S. et McFarlane, J. C., 1995).
- Figure I-3.** Gamme de coefficients de partage octanol/eau (Kow) pour diverses classes de pesticides et polluants industriels. Les astérisques indiquent les composés ionisables, les valeurs de Kow sont indiquées pour la molécule non dissociée (d'après Trapp, S. et McFarlane, J. C., 1995).
- Figure I-4.** Voies du mouvement des xénobiotiques dans les plantes après absorption par le sol déterminées par la constante de la loi de Henry.
- Figure I-5.** Représentation des tissus phloémiens d'une tige de tabac (d'après Hopkins, W. G., 1999).
- Figure I-6.** Métabolisme des xénobiotiques dans la plante (d'après Sandermann, H., 1992).
- Figure I-7.** Modèle cinétique simple du métabolisme des xénobiotiques chez les plantes (d'après Trapp, S. et McFarlane, J. C., 1995).
- Figure I-8.** Structure de l'imidaclopride ou 1-(6-chloro-3-pyridylméthyle)-N-nitroimidazolidine-2-ylidèneamine.
- Figure I-9.** Voies métaboliques de l'imidaclopride chez les plantes.
- Figure I-10.** Voies de dégradation de l'imidaclopride dans le sol d'après Fahl, U. et Leicht, W., 2001).
- Figure I-11.** Dessin d'une plante de tomate (*Lycopersicum esculentum* Miller) indéterminée composée de sympodes (un bouquet et trois feuilles : deux sous le bouquet et une au-dessus du bouquet).

Chapitre II ABSORPTION ET TRANSFERT DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE APRES TRAITEMENT DU SOL

- Figure II-a.** Plantules de tomate prêtes à être transplantées.
- Figure II-b.** Plantes de tomate avant la floraison.
- Figure II-c.** Inflorescence d'une plante de tomate.
- Figure II-d.** Fruits d'une plante de tomate variant par le degré de maturité.
- Figure II-1.** Autoradiographie d'un plant de tomate 3 jours après absorption racinaire d'une solution de [^{14}C] imidaclopride.
- Figure II- 2.a.** Quantité des résidus d'imidaclopride dans la plante de tomate en fonction de la quantité d'imidaclopride dans le sol.
- Figure II-2.b.** Concentration des résidus d'imidaclopride dans les plantes de tomate en fonction de la quantité d'imidaclopride dans le sol.
- Figure II-3.** Relation entre le poids sec et la quantité de résidus d'imidaclopride dans les feuilles de tomate de la série standard.
- Figure II-4.** Concentration des résidus d'imidaclopride dans les feuilles de plante de tomate de la série standard, $n = 1$ = feuille la plus basse.
- Figure II-5.** Relation entre le poids sec et la quantité de résidus d'imidaclopride dans les fruits de tomate de la série standard.
- Figure II-6.** Concentration des résidus d'imidaclopride dans les feuilles de tomate de la série excision de l'apex.
- Figure II-7.** Relation entre le poids sec et la quantité de résidus d'imidaclopride dans les fruits de tomate de la série d'excision de l'apex.
- Figure II-8.** Concentration des résidus d'imidaclopride dans les feuilles de tomate de la série changement de sol.
- Figure II-9.** Relation entre le poids sec et la quantité des résidus d'imidaclopride dans les fruits de tomate de la série changement de sol.
- Figure II-10.** Quantité des résidus d'imidaclopride dans les feuilles et les racines de tomate après différents temps de vieillissement de l'imidaclopride dans le sol.
- Figure II-11.** Quantité de résidus d'imidaclopride dans des plantes de tomate à différents âges (âge de la plante = jours après transplantation + 15).
- Figure II-12.** Relation entre la quantité d'eau absorbée par la plante de tomate et la quantité de résidus.

Figure II-13.a. Relation entre le poids frais des feuilles et la quantité d'eau transpirée.

Figure II-13.b. Relation entre le poids sec des feuilles et la quantité d'eau transpirée.

Figure II-14.a. Relation entre la quantité d'eau transpirée et la quantité de résidus dans les feuilles.

Figure II-14.b. Relation entre le poids sec des feuilles et la quantité de résidus.

Figure II-15. Concentration de résidus d'imidaclopride dans des feuilles de tomate variées par l'âge.

Figure II-16. Relation entre le poids sec de fruits et la quantité de résidus.

Chapitre III ABSORPTION ET TRANSFERT DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE APRES TRAITEMENT FOLIAIRE

Figure III-1. Schéma représentant l'écoulement sous pression. Le chargement des glucides dans le tube criblé adjacent à la cellule source provoque une absorption osmotique d'eau des éléments du xylème qui sont proches (d'après Hopkins, W. G., 1999).

Figure III- 2. Autoradiographie d'un plant de tomate 7 jours après le traitement de la foliole terminale d'une feuille par une solution de [^{14}C] imidaclopride.

Figure III-3. Quantité de résidus d'imidaclopride dans les différentes parties de la plante de tomate après le traitement foliaire.

Figure III-4. Concentration de résidus d'imidaclopride dans les différentes parties de la plante de tomate après le traitement foliaire.

Figure III-5. Répartition des résidus d'imidaclopride dans les différentes parties des plantes de tomate lors de l'essai de remobilisation.

Figure III-6. Concentration des résidus d'imidaclopride dans les différentes parties développées après la transplantation de plantes chargées en [^{14}C] imidaclopride, en rouge : fruits des bouquets n à n+x, en vert : feuilles.

Figure III-7. Schéma montrant la position de l'inactivation thermique du phloème du premier ou du deuxième bouquet.

Figure III-8. Comparaison des flux de résidus entrant dans les fruits

a. du 2ème bouquet ; b. du 1er bouquet après inactivation du phloème (X) ou non (X+P).

Figure III-9. Comparaison des flux de résidus entrant dans les fruits du 1^{er} et du 2^{ème} bouquet après inactivation du phloème

a. du bouquet 2 ; b. du bouquet 1. X : xylème ; P : phloème.

Chapitre IV METABOLISME DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE

Figure IV-1. Radiochromatogramme obtenu par collecte après élution par CLHP d'un extrait de cellules de tomate incubées 168 h avec le [¹⁴C] imidaclopride, 4 tubes = 1 min.

Figure IV-2. Spectre de masse de l'imidaclopride.

Figure IV-3. Spectres de masse (SM²) des ions moléculaires ³⁵Cl des 2 métabolites détectés sous le pic 4 : a. dénitro-imidaclopride ou guanidine ; b. dénitro-oléfine.

Figure IV-4. Spectre de masse (SM²) de l'ion moléculaire *m/z* 254 du métabolite détecté sous le pic 5 : oléfine.

Figure IV-5. Spectres de masse du composé détecté sous le pic 3 dans les extraits cellulaires.
a. SM des ions moléculaires
b. SM² de l'ion moléculaire *m/z* 268 avec en cartouche la fragmentation de l'ion.

Figure IV-6.a. Métabolisme de l'imidaclopride dans la feuille numéro 3 d'une plante de tomate après 30 jours de contamination du sol.

Figure IV-6.b. Métabolisme de l'imidaclopride dans la feuille numéro 6 d'une plante de tomate après 30 jours de contamination du sol.

Figure IV-7. Métabolisme de l'imidaclopride dans la feuille numéro 14 d'une plante de tomate après 60 jours de contamination du sol.

Figure IV-8. Métabolisme de l'imidaclopride dans les racines de tomate après 60 jours de contamination du sol.

Figure IV-9. Métabolisme de l'imidaclopride dans les fruits de tomate après 60 jours de contamination du sol.

Figure IV-10. Métabolisme de l'imidaclopride dans les feuilles traitées.

Figure IV-11. Métabolisme de l'imidaclopride dans les feuilles situées en haut de la 1^{ère} inflorescence (feuilles hautes de la plante) après le traitement foliaire.

Figure IV-12. Métabolisme de l'imidaclopride dans des feuilles situées en bas de la 1^{ère} inflorescence (feuilles basses de la plante) après le traitement foliaire.

Figure IV-13. Métabolisme de l'imidaclopride dans les racines de plante de tomate après le traitement foliaire.

Figure IV-14.a. Métabolisme de l'imidaclopride dans des tranches de fruits verts de tomate.

Figure IV-14.b. Métabolisme de l'imidaclopride dans des tranches de fruits orange de tomate.

Figure IV-14.c. Métabolisme de l'imidaclopride dans des tranches de fruits rouge de tomate.

Figure IV-15. La déshydratation du 5-hydroxy-imidaclopride.

Figure IV-16. Ouverture du cycle imidazolidine de la guanine en résidu chloronicotinique portant une chaîne latérale guanidinique ouverte et perte des carbones 4 et 5.

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I INTRODUCTION

Tableau I-1. Propriétés physico-chimiques de l'imidaclopride.

Chapitre II ABSORPTION ET TRANSFERT DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE APRES TRAITEMENT DU SOL

Tableau II-1. Quantité et distribution des résidus d'imidaclopride absorbées par les plantes à différents temps pour la série standard.

Tableau II-2. Quantité et distribution de résidus d'imidaclopride dans les plantes de tomate pour la série excision de l'apex.

Tableau II-3. Quantité et distribution des résidus d'imidaclopride absorbés par les plantes à différents temps pour la série changement du sol.

Chapitre III ABSORPTION ET TRANSFERT DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE APRES TRAITEMENT FOLIAIRE

Tableau III-1. Transpiration des fruits 7 jours après la séparation de la plante. n = 8.

Chapitre IV METABOLISME DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE

Tableau IV-1. Compartimentation métabolique de la culture.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	1
1. Absorption et transfert des xénobiotiques.....	6
1.1. Influence de la structure de la plante.....	8
1.2. Propriétés physico-chimiques des xénobiotiques.....	9
1.2.1. Pression de vapeur.....	9
1.2.2. Lipophilie et solubilité dans l'eau.....	9
1.2.3. Transfert de molécules ionisées à travers les membranes	11
1.3. Systèmes d'étude.....	11
1.4. Absorption et transfert à partir du sol	12
1.4.1. Disponibilité dans le sol.....	12
1.4.2. Absorption à partir du sol	13
1.4.3. Translocation des racines vers les parties aériennes	14
2. Absorption et transfert à partir des feuilles	15
2.1. Absorption par la cuticule	15
2.2. Transfert dans le xylème.....	16
2.3. Transfert dans le phloème	16
3. Transfert des pesticides vers les fruits	19
3.1. Modèles	19
3.2. Exemples.....	19
4. Métabolisme des xénobiotiques	21
4.1. Les différentes phases.....	21
4.1.1. Phase I.....	22
4.1.2. Phase II.....	24

4.1.3. Phase III	25
4.2. Enzymes impliquées dans le métabolisme	25
4.2.1. Monooxygénases à cytochrome P-450	25
4.2.2. Peroxydases, phénol oxydases et oxydo-réductases.....	26
4.2.3. Hydrolases	26
4.2.4. Nitroréductases	27
5. Les insecticides chloronicotinyles	27
5.1. Imidaclopride	28
5.1.1. Propriétés physico- chimiques de l'imidaclopride.....	29
5.1.2. Effets toxicologiques	29
5.1.2.1. Toxicité aiguë.....	29
5.1.2.2. Toxicité chronique	30
5.1.2.3. Effets mutagéniques.....	30
5.1.2.4. Effets sur la reproduction	30
5.1.2.5. Effets tératogènes	31
5.1.2.6. Effets cancérogènes	31
5.1.2.7. Effet chez l'abeille	31
5.1.3. Métabolisme de l'imidaclopride	33
5.1.4. Devenir environnemental dans le sol	37
6. La tomate	38
6.1. Les particularités structurelles du xylème et du phloème chez la tomate.....	40
6.1.1. Le xylème chez la tomate	40
6.1.2. Le phloème chez la tomate.....	40

II. ABSORPTION ET TRANSFERT DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE

APRES TRAITEMENT DU SOL.....	45
1. Introduction.....	45
2. Traitement du sol	46
2.1. Matériel et méthodes	46
2.1.1. Produits chimiques et standards de synthèse.....	46
2.1.2. Détermination de la radioactivité.....	46
2.1.3. Autoradiographie	46
2.1.4. Absorption et transfert à différentes doses	47
2.1.5. Protocole d'essais.....	47
2.2. Résultats	50
2.2.1 Autoradiographie	50
2.2.2 Absorption en fonction de la dose	50
2.2.3. Cinétique de translocation	52
2.2.3.1. Série standard.....	52
2.2.3.2. Série excision de l'apex	56
2.2.3.3. Série changement du sol	58
2.2.4. Biodisponibilité de l'imidaclopride	60
2.2.4.1. Méthode	60
2.2.4.2. Résultats.....	61
3. Transpiration.....	62
3.1. Méthodes.....	62
3.2. Résultats	62
4. Discussion.....	69

III. ABSORPTION ET TRANSFERT DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE

APRES TRAITEMENT FOLIAIRE.....	75
1. Introduction.....	75
2. Traitement Foliaire	79
2.1. Méthodes.....	79
2.1.1. Autoradiographie	79
2.1.2. Traitement foliaire ciblé.....	79
2.1.3. Remobilisation	80
2.2. Résultats	80
2.2.1. Autoradiographie	80
2.2.2. Traitement ciblé.....	82
2.2.3. Remobilisation	83
3. Inactivation du phloème	85
3.1. Méthodes.....	86
3.1.1. Inactivation thermique du phloème.....	86
3.1.2. Détermination de la transpiration des fruits.....	87
3.1.3. Protocole des essais.....	87
3.2. Résultats	88
3.2.1. Inactivation du phloème et traitement foliaire	88
3.2.2. Transpiration des fruits	91
4. Discussion.....	91
IV. METABOLISME DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE.....	97
1. Introduction.....	97
2. Matériel et méthodes.....	98
2.1. Culture cellulaire	98

2.1.1. Conditions de culture	98
2.1.2. Métabolisme cellulaire	99
2.2. Métabolisme dans les fruits ex vivo.....	99
2.3. Préparation des extraits de plantes.....	100
2.4. Purification sur une cartouche SPE (Extraction en Phase Solide)	100
2.5. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).....	101
2.6. Spectrométrie de masse.....	101
3. Résultats.....	102
3.1. Métabolisme cellulaire	102
3.2 Métabolisme dans la plante entière.....	108
3.2.1. Après le traitement du sol.....	108
3.2.2. Après le traitement foliaire.....	111
3.2.3. Remobilisation	114
3.3. Métabolisme dans les fruits ex vivo.....	114
4. Discussion.....	116
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	123
BIBLIOGRAPHIE.....	129

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Les produits phytosanitaires sont présents de façon importante sur la planète depuis déjà plus d'un demi-siècle. Des milliers de tonnes de pesticides ont ainsi été répandues dans la nature depuis le début de leur commercialisation. Ces produits ont contribué à modifier notre environnement et par voie de conséquence les espèces vivantes que l'on y trouve, au premier rang desquelles se situe l'homme. Les pesticides, et parfois aussi leurs produits de dégradation, présentent un certain nombre d'effets indésirables chez l'homme comme par exemple des effets cancérigènes, mutagènes, hormonaux et des effets néfastes sur la reproduction. L'utilisation des produits phytosanitaires sur cultures légumières et fruitières peut ainsi conduire à la présence de résidus situés sur ou dans la partie consommable du végétal traité.

La présence de ces résidus pose donc un problème de sécurité alimentaire pour les consommateurs. Bien que la réglementation impose une teneur maximale en résidus sur la base d'études toxicologiques, les consommateurs deviennent aussi plus exigeants et souhaitent, maintenant qu'ils ont à leurs disposition des produits en abondance et de bonne qualité, une absence totale de résidus de pesticides dans les fruits et les légumes, à la fois de la molécule parente mais aussi de ses produits de dégradation, c'est-à-dire un « niveau zéro de résidus de pesticides ».

L'évaluation du risque de contamination des organes végétaux consommés demande une bonne caractérisation des transferts de ces produits à l'intérieur de la plante. Si ces transferts sont bien identifiés pour les molécules parentes, par rapport aux connaissances nécessaires à cette évaluation, peu de données existent sur la mobilité des métabolites, particulièrement en direction de la sphère reproductive, fleurs et fruits. Ainsi, la circulation des produits phytosanitaires dans la plante, du sol vers les parties aériennes par la circulation de la sève brute dans le xylème ou à partir des feuilles par la sève élaborée dans le phloème est très bien décrite, les principaux facteurs expliquant cette mobilité étant les caractéristiques physico-chimiques de la substance considérée.

Hormis leur transport dans la plante, les xénobiotiques sont soumis dans la plante à des réactions variées, regroupées sous le terme de métabolisme, qui génèrent des résidus ou métabolites. Certains de ces métabolites tels que les glycoconjugués pourraient présenter des caractéristiques physico-chimiques assez proches des substrats photosynthétiques, notamment en termes de polarité. Les métabolites sont stockés en raison de l'absence d'organe

d'excrétion dans la plante, principalement dans les vacuoles et les parois cellulaires des végétaux. Il en est de même pour les composés endogènes de la plante tels que les produits issus de la photosynthèse, les photoassimilats. En fonction des besoins des différents organes de la plante, une partie des produits issus de la photosynthèse est exportée sous forme de saccharose des feuilles vers les autres tissus de la plante et une autre partie est temporairement accumulée dans les feuilles, soit en tant que tel, soit sous forme de polymères comme l'amidon dans les chloroplastes ou dans les vacuoles. L'amidon et le saccharose seront ensuite mobilisés afin d'entretenir la respiration ainsi que d'autres besoins métaboliques durant la nuit ou lors des périodes de faible rendement photosynthétique, ou utilisés pour le remplissage des fruits : c'est le mécanisme d'allocation des photoassimilats. Cependant, des études relativement récentes montrent que l'allocation peut être un phénomène différé et qu'une partie de ces composés endogènes n'est transférée vers les fruits qu'après une mise en réserve assez longue dans les feuilles. Dans ce contexte, il est important de déterminer si un tel mécanisme d'allocation existe également pour les pesticides et leurs métabolites, pouvant entraîner une différenciation entre traitement et contamination postérieure des fruits. Les études sur le sujet sont actuellement très parcellaires, voire quasi-inexistantes.

L'objectif de ma thèse était d'évaluer le risque de contamination des fruits par des produits de traitement absorbés par le végétal. Il s'agissait d'une part de déterminer si un produit de traitement, en l'occurrence l'imidaclopride ou certains de ces métabolites peuvent être transférés dans le fruit par voie systémique, c'est-à-dire en utilisant les processus physiologiques de transport de la plante et d'autre part de déterminer les facteurs qui contrôlent ce transfert.

L'imidaclopride a été choisi comme modèle car c'est un insecticide donc a priori non phytotoxique et que ses propriétés systémiques permettent sa distribution dans la plante après un traitement du sol ou de la semence ou après sa pulvérisation sur les feuilles. La tomate a été choisie comme plante modèle pour son développement axial facilement contrôlable pour la variété choisie.

Plusieurs expérimentations ont été réalisées pour étudier l'absorption et le transfert de l'imidaclopride dans la plante en analysant les différents organes, feuilles, fruits, racines et tiges au cours du temps et à différents stades de maturité. Par ailleurs, le métabolisme de l'imidaclopride a été étudié dans les différents organes afin d'établir la carte métabolique de ce composé chez la tomate. Le transfert des métabolites à l'intérieur de la plante a également été analysé.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

L'utilisation de produits chimiques est considérée dans l'agriculture moderne comme indispensable bien que se développe à ses côtés une agriculture appelée biologique n'utilisant pas ces produits trivialement nommés pesticides. Il en existe principalement trois catégories : les herbicides, pour lutter contre les plantes adventices nuisibles (les mauvaises herbes), les fongicides, pour lutter contre les champignons et les insecticides pour lutter contre les insectes. On trouve également des produits ayant une action sur les rongeurs (rodenticides), sur les escargots et les limaces (molluscicides) entre autres.

Au XIX^e et au début du XX^e siècle, ces produits étaient essentiellement inorganiques, sulfate de cuivre, sels arsenicaux et huiles minérales, et leur toxicité pouvait être très élevée tant pour les organismes visés que pour les hommes. Après la deuxième guerre mondiale, sont apparus les pesticides organiques tels que le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), un insecticide organochloré qui allait devenir célèbre, tant par son efficacité que par sa toxicité et sa persistance environnementale. L'emploi des pesticides organiques dans les pays industrialisés s'est constamment accru de 1945 jusqu'au début des années 1990. Parmi eux, les herbicides sont les pesticides les plus vendus, avec 59% du marché, suivis des insecticides (16%) et des fongicides (10%). En termes de groupes chimiques, ce sont les carbamates (herbicides, insecticides et fongicides) qui sont les plus vendus (14% du marché), suivis de près par les herbicides appartenant aux groupes des amides, des acétamides et des anilines (14%), des triazines et des triazoles (12%) et des aryloxyacides, groupe comprenant entre autres le 2,4-D ou acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (11%). Plus l'agriculture est intensive, plus elle utilise d'intrants dont les pesticides. En France, les 14,3 millions d'hectares de forêts et les 18 millions d'hectares de productions végétales diverses (céréales, betteraves, pommes de terre, etc.) consomment 90% des pesticides commercialisés chaque année, ce qui représente plus de 53 500 tonnes en 2004. La France est le premier pays consommateur de ces produits de l'Union européenne et le troisième au niveau mondial après les USA et le Japon (<http://www.univers-nature.com/dossiers/pesticides/>), le marché européen étant le deuxième marché mondial avec 76 100 tonnes de matières actives commercialisées en 2004. Les pesticides ont constitué un énorme progrès dans la maîtrise des ressources alimentaires et pour l'amélioration de la santé publique, en particulier dans la lutte contre les insectes, vecteurs de maladies.

Cependant, le revers de la médaille est apparu rapidement sous la forme de phénomènes de résistance chez les insectes et les mauvaises herbes, de troubles de la reproduction chez les oiseaux, qui ont montré les limites et les dangers de ces substances pour les écosystèmes.

Vis-à-vis de l'homme, les pesticides présentent un certain nombre d'effets indésirables comme par exemple des effets cancérigènes et mutagènes et des effets négatifs sur la reproduction. Certains composés des pesticides sont soupçonnés d'être responsables de troubles de la fertilité masculine surtout dans les populations les plus exposées telles que les agriculteurs. Les agriculteurs qui utilisent l'alachlore, un désherbant couramment utilisé dans les champs de maïs et de soja ont trois fois plus de risque de développer une leucémie. Une importante étude américaine montre à nouveau que les produits chimiques utilisés en agriculture sont dangereux pour la santé de ceux qui les utilisent (Lee, 2004). Les femmes travaillant à la ferme sont plus susceptibles de développer un cancer du sein que les autres, selon une étude Canadienne (http://www.mdrgf.org/pdf/NYAS_1076_765_777%20final.pdf).

Les premiers résultats d'une étude sur l'impact des pesticides et des produits phytosanitaires sur les tumeurs cérébrales, l'étude "Cerephy" a permis de mettre en évidence que les risques de tumeurs cérébrales sont multipliés par 2,6 pour les populations agricoles les plus exposées professionnellement à ces produits et par plus de 3,2 pour certains types de tumeurs du cerveau (gliome). L'étude a été menée en Gironde, une région viticole du sud-ouest de la France particulièrement consommatrice de pesticides (Colloque cancers professionnels ARC / FNATH - 03/2006, La dépêche de l'AFP : Les pesticides font augmenter le risque de tumeur cérébrale, Cyberpresse Sciences, 22.03.06).

Outre les effets cancérigènes, une étude menée de 1999 à 2001 par la MSA et l'Inserm a montré que le risque de développer la maladie de Parkinson est multiplié par 1,9 chez les personnes exposées aux pesticides agricoles pendant plus de 15 ans.

L'exposition aux pesticides se caractérise par une multiplicité des voies d'entrée, en effet ces substances peuvent pénétrer dans l'organisme à la fois par contact cutané, par ingestion et par inhalation.

Les agriculteurs sont ainsi les populations les plus exposées. On distingue donc généralement deux niveaux d'exposition :

- les expositions primaires, elles concernent les personnes manipulant les produits, au moment de la préparation, de l'application mais aussi du nettoyage des appareils de traitement.

Les populations concernées sont bien évidemment les agriculteurs et les professionnels mais tout un chacun est également exposé lors de l'utilisation de produits à usage domestique ou d'entretien des jardins. Les premières victimes sont les personnes qui manipulent les pesticides et courent des risques d'accident et d'empoisonnement.

- les expositions secondaires, elles concernent l'ensemble de la population qui est exposé aux résidus de l'usage de ces produits, au travers de son alimentation et de son environnement.

Dans cette population, l'INSERM a montré par exemple que les enfants fréquemment exposés à des insecticides ménagers utilisés sur les plantes, les parterres ou dans les shampoings anti-poux courent un risque de développer une leucémie infantile deux fois plus important que les autres (<http://www.pesticides-etudes.mdrgf.org/2006/03/insecticides-mnagers-et-leucmie-chez.html>).

De même, une étude épidémiologique américaine réalisée sur plus de 140 000 personnes, publiée en 2006 par des chercheurs de l'école de santé publique de Harvard à Boston, conclut que l'exposition aux pesticides augmente le risque de développer la maladie de Parkinson de 70% (Ascherio, 2006).

Un lien a également été trouvé, malgré des facteurs de confusion possible (pollens et exposition fongique) entre les pesticides et l'asthme : captafol, soufre, pyréthrine et pyréthrinoides, dérivés nitriles, et quelques organophosphorés et carbamates (http://pesticides.free.fr/article.php3?id_article=1).

De plus, les produits de dégradation peuvent se révéler plus toxiques que la molécule parente. Chez l'homme, de nombreux composés aromatiques sont convertis en époxydes par les monooxygénases microsomales. La biotransformation du bromobenzène en son époxyde et les réactions ultérieures sont un exemple intéressant de bioactivation et de ses conséquences. La bioactivation est localisée principalement dans le foie, et les métabolites réactifs résultant sont toxiques par liaison covalente aux macromolécules tissulaires, provoquant des nécroses ou la formation de cancers. Le parathion, insecticide organophosphoré, est bioactivé par le foie en paraoxon, inhibiteur beaucoup plus puissant des acétylcholinestérases que la molécule mère. Des chercheurs de l'école de santé publique de l'université de Harvard ont montré que des hommes exposés à de faibles doses de certains insecticides voient leur taux de testostérone diminuer. Les molécules en cause sont le TCPY (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), un métabolite du chlorpyrifos et du chlorpyrifos-méthyl et le 1-naphtol, un métabolite du carbaryl et du naphtalène.

Tous ces insecticides ont subi une restriction de commercialisation, tant par l'Union européenne que par les Etats-Unis, du fait de leur toxicité pour la santé humaine et de leur dangerosité pour l'environnement (<http://www.pesticides-etudes.mdrgf.org/2006/03/baisse-de-la-fertilit-les-pesticides.html>). Pour les autres produits, des limites maximales de résidus (LMR) sont établies et doivent garantir à la population une absence de risque lors de la consommation de ces denrées. Ces LMR permettent un suivi des résidus dans l'alimentation et de nombreux contrôles sont effectués pour en montrer les teneurs. Une grande majorité des fruits et légumes consommés en Europe contiennent des traces de résidus de pesticides. Plusieurs produits chimiques, y compris certains non autorisés, sont détectés dans les salades, les carottes, les agrumes, les poires, les raisins, mais aussi dans la nourriture pour bébés. Toutefois, selon la direction générale de la protection des consommateurs de la Commission européenne, 95% des échantillons testés ne dépassent pas la limite maximale autorisée. Au niveau européen, 8,7% des aliments pour bébés contiennent des résidus de pesticides et 2,7% d'échantillons dépassent les LMR.

Les analyses effectuées par la DGCCRF pour la Commission européenne ont révélé que près de 53% des fruits, légumes et céréales consommés en France en 2002 contiennent des résidus de pesticides, dont plus de 9% à des doses supérieures aux limites européennes maximales de résidus admises (Etude menée en 2002 par la Direction de la santé et de la protection des consommateurs de la Commission européenne (DG SANCO)).

Pour la France en 2004, ce sont 48% des aliments qui contiennent des résidus de pesticides dont 4% qui dépassent les LMR. Si ce chiffre de 48% montre une très légère baisse par rapport à l'année précédente, les résultats sont très contrastés. En effet, si la situation semble s'améliorer pour les légumes (34% d'aliments contaminés en 2004 contre 41% en 2003), la situation est inverse pour les fruits : 65,7% contiennent des pesticides en 2004 contre 64,5% en 2003 et surtout pour les céréales où il n'y avait aucun dépassement de LMR en 2003 alors qu'en 2004 ce sont 2,4% des céréales analysées qui sont au-dessus des LMR, pour un total de 50% d'échantillons contaminés soit plus qu'en 2003.

Les résidus multiples sont aussi de plus en plus fréquents puisqu'on est passé de 23,7% des échantillons d'aliments végétaux contenant de 2 à 8 pesticides différents en 2003 à 25,5% de ces aliments contaminés par des résidus multiples en 2004. Et en Europe, on assiste à la même tendance, + 3% d'échantillons avec des résidus multiples de pesticides dans les végétaux et les céréales, on passe en 2003 de 20,5% à 23,4% en 2004.

La DGCCRF présente les résultats de manière rassurante en précisant que : « Pour les fruits et les légumes 93,4% des échantillons sont conformes et 6,7% présentent une teneur en résidus dépassant la LMR autorisée (nationale ou communautaire) (http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/03_publications/com_ddp/residuspesticides.pdf).

Mais pour certains comme le professeur Dominique Belpomme (cancérologue à l'Hôpital européen Georges-Pompidou), ces limites réglementaires ne sont pas suffisantes pour protéger les gens contre les maladies car les résidus de pesticides s'accumulent dans les graisses humaines. De nombreuses études scientifiques les soupçonnent de perturber le système endocrinien et d'être à l'origine de certains cancers (Moins de résidus de pesticides sur les fruits et légumes ? (PESTInfos 30.01.06).

Pour la population ou le consommateur de base plus ou moins bien informé, ces études font état d'un danger auquel il serait exposé par la présence de résidus de pesticides dans les denrées alimentaires. Et comme le disaient récemment l'UE et l'OMS, « la sécurité alimentaire est l'affaire de tous, de la fourche à la fourchette » (<http://www.eufic.org/article/fr/page/BARCHIVE/expid/basics-securite-alimentaire/?lowres=1>). La qualité et la sécurité d'un aliment dépendent des efforts fournis par chaque acteur de la chaîne alimentaire, de l'agriculteur au consommateur. Les pesticides et leurs résidus constituent donc aujourd'hui un véritable problème de société. De plus, depuis près de cinquante ans, ils ont été mis en évidence dans tous les compartiments de l'environnement, le sol, les eaux des rivières et les nappes phréatiques, l'air et les eaux de pluie. On les rencontre donc dans les fruits, les légumes, les céréales mais aussi dans les produits d'origine animale (viande, poisson, lait et œuf) et aussi dans l'environnement. Ils existent soit sous leur forme initiale, substances actives, soit sous une forme partiellement dégradée. Par exemple, les pesticides organochlorés (OCP) comprenant le DDT, le chlordane, l'aldrine, le toxaphène et l'heptachlore sont généralement fortement persistants dans le sol et peuvent encore être retrouvés de nos jours bien qu'ils aient été interdits depuis 20 à 30 ans. L'absorption d'OCP hydrophobes par des carottes, des choux, des pommes de terre, des concombres, des épinards, des laitues et d'autres cultures a été largement rapportée (Lichtenstein, 1959 ; Schroll et Scheunert, 1992 ; Mattina et al., 2000). Dans ces études, les sols n'avaient pas été traités depuis cinq à vingt ans.

En outre, la végétation peut permettre la migration des produits chimiques du sol vers les parties aériennes. L'accumulation dans la végétation est aussi un important point de départ pour les phénomènes de transfert dans la chaîne alimentaire, fournissant un itinéraire par lequel la faune sauvage, les animaux domestiques et finalement les gens vont pouvoir être exposés aux produits chimiques présents dans le sol. Avec une surface couvrant plus de 80% de la partie terrestre du globe (Ockenden et al., 1998), le rôle des plantes dans les transferts de polluants à l'interface plante/air et plante/sol est critique vis-à-vis de l'évaluation des risques pour la santé humaine (McLachlan, 1996). Pour ces différentes raisons, les consommateurs deviennent de plus en plus méfiants quant à l'utilisation des pesticides et souhaitent avoir un niveau zéro de résidus de pesticides dans leurs fruits et légumes (Krammer, 1990).

1. Absorption et transfert des xénobiotiques

L'évaluation du risque de la contamination de ces organes demande une bonne caractérisation des transferts de ces produits à partir de la partie traitée de la plante. Légalement, les fruits et légumes ne doivent pas dépasser la LMR en pesticides avec lesquels ils sont traités. La LMR pour un pesticide donné et pour un végétal donné est établie à partir de données concernant le transfert dans le végétal concerné et la toxicité du pesticide. Suivant la nature de la toxicité, un facteur de sécurité est établi permettant d'assurer la sécurité du consommateur. Vis-à-vis du transfert dans la plante, il existe deux catégories principales de pesticides : les pesticides non systémiques et les pesticides systémiques (Figure I-1).

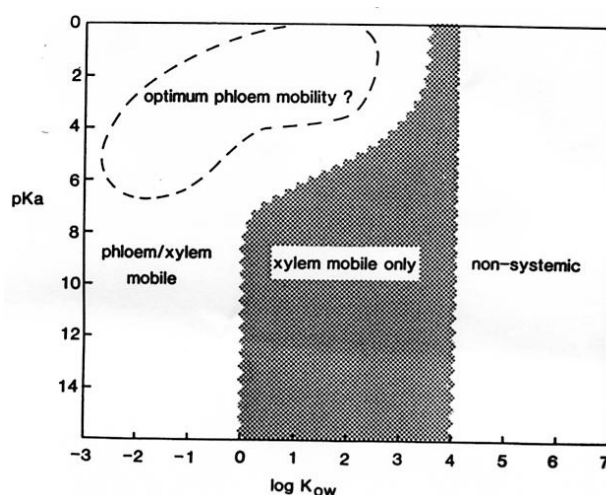


Figure I-1. Propriétés physico-chimiques des acides faibles et des composés non ionisés pour différents types de comportement systémique (d'après Bromilow, R. H. et Chamberlain, K., 1989).

Les pesticides non systémiques ou de contact n'ont pas, ou alors très faiblement, la capacité de pénétrer dans les tissus des plantes et d'être transférés du site de contact vers les parties distales de la plante. Ainsi, le parasite doit être en contact direct avec le pesticide sur le végétal ou être atteint directement par la pulvérisation. Les pesticides systémiques, eux, peuvent pénétrer dans les tissus des plantes et être transférés vers d'autres parties de la plante que la zone traitée ; le produit chimique pénètre dans la plante au travers de la cuticule des feuilles après pulvérisation ou est absorbé par les racines après traitement du sol.

Certains produits chimiques se déplacent seulement dans le xylème (apoplaste) et le courant de transpiration est le moteur de la circulation du pesticide vers le sommet de la plante à partir du site d'application. Les produits chimiques se déplaçant dans le phloème (symplaste) de la plante peuvent être transportés de façon acropétale et basipétale à partir du site d'application (systémique vrai). Les produits chimiques se déplaçant à la fois dans le xylème et le phloème sont appelés produits ambimobiles.

Beaucoup de recherches ont été effectuées sur l'absorption par la plante des herbicides et leur translocation à partir du site d'exposition parce que c'est une composante essentielle de l'efficacité de nombreux herbicides.

Le mode de translocation d'un herbicide dans une plante dépend du site d'application du composé et aussi sur sa capacité de pénétrer dans les membranes cytoplasmiques. Deux modes majeurs de transport d'herbicide ont été largement décrits (Ashton, 1960). À savoir le mode apoplastique et le mode symplastique. Le mouvement dans l'apoplaste s'effectue principalement via le xylème et les parois cellulaires tandis que le mouvement dans le symplaste se fait via les plasmodesmes connectant les cellules du parenchyme et du phloème (Jachetta, 1986). Cependant chez la tomate, le mouvement par les plasmodesmes est rare car il n'y a pas de continuum entre le parenchyme chlorophyllien et le phloème donc le passage du saccharose s'effectue à travers les parois.

Les herbicides qui se déplacent selon le mode de transport symplastique, lorsqu'ils sont appliqués sur les feuilles, les tiges ou les racines de plantes, doivent initialement se déplacer à travers l'apoplaste des cellules de l'épiderme. Ces composés sont alors en position pour pénétrer dans le milieu cellulaire où ils sont disponibles pour un transport, via le phloème, jusqu'aux sites actifs.

Les herbicides qui se déplacent seulement selon le mode de transport apoplastique ne sont pas exportés hors des feuilles lorsqu'ils sont appliqués sur les feuilles. Quand ces produits sont

appliqués au niveau des tiges ou des racines, ils se déplacent apparemment dans l'apoplaste et sont transportés dans le courant de transpiration jusqu'aux feuilles. Il n'y a pratiquement aucun mouvement symplastique de ces composés hors des feuilles (Hay, 1976). Cependant, certains produits chimiques peuvent se déplacer selon les deux systèmes et sont dits ambimobiles (Edgington, 1977).

A la fois l'absorption et le transfert de pesticides chez les plantes sont importants pour l'activité de nombreux composés (pesticides systémiques) et aussi pour estimer la distribution probable de résidus de pesticides dans les végétaux consommés. L'absorption des produits chimiques par les plantes à partir du sol et de l'atmosphère puis leur distribution ultérieure dans les tissus sont affectées par les propriétés diverses du composé, la plante elle-même et son environnement. Ces facteurs incluent (1) les caractéristiques des plantes comme la nature du système racinaire, les lipides contenus dans les cires, la morphologie de la feuille ; (2) les propriétés physico-chimiques de la substance telles que le poids moléculaire, la pression de vapeur, la solubilité aqueuse ou la lipophilie (Topp, 1986, Bacci, 1990, Trapp, 1990) et (3) les caractéristiques environnementales comme la composition organique et minérale du sol (Scheunert, 1985, Ryan et al., 1988) ou le climat (Hawxby, 1972).

1.1. Influence de la structure de la plante

Les xénobiotiques, substances étrangères à un organisme, pénétrant par les racines peuvent soit se déplacer dans les espaces intercellulaires du cortex, une partie de l'apoplaste soit pénétrer jusqu'à l'endoderme (Figure I-2).

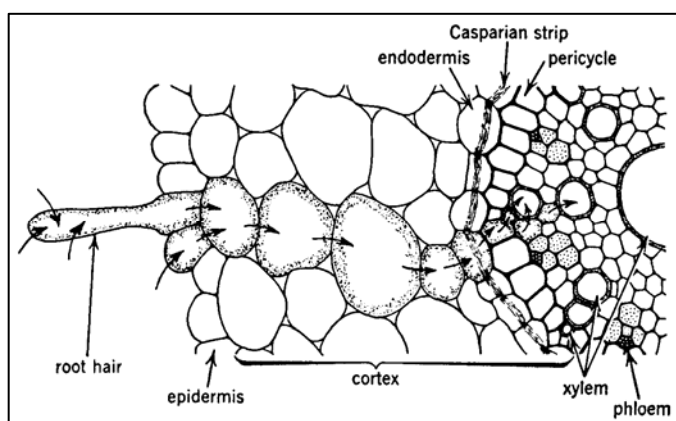


Figure I-2. Schéma d'une coupe transversale de racine de blé montrant les voies possibles du mouvement de l'eau et des composés solubles (d'après Trapp, S. et McFarlane, J. C., 1995).

Là, une gaine cylindrique de cellules qui sont étroitement liées ensemble par les cadres de Caspary entoure les tissus vasculaires réunis dans la stèle. Cette bande bloque plus ou moins efficacement selon les plantes tout transfert apoplastique vers les tissus vasculaires.

Pour passer au-delà de l'endoderme, les composés apoplastiques doivent alors aussi pénétrer dans les cellules de l'endoderme : ceux qui peuvent franchir cette barrière peuvent ensuite se déplacer vers les parties aériennes via le système apoplastique du xylème. Pour être véhiculés à partir des racines vers l'ensemble de la plante, les composés doivent ainsi franchir la membrane cytoplasmique des cellules et ainsi posséder un certain caractère lipophile. Un autre facteur important lors des transferts est constitué par la différence de pH entre les différents compartiments de la plante qui agit sur le transfert des molécules ionisables.

1.2. Propriétés physico-chimiques des xénobiotiques

Les propriétés physico-chimiques des molécules sont un des facteurs essentiels de leur absorption.

1.2.1. Pression de vapeur

Le transfert du sol vers la plante par la phase vapeur peut se révéler non négligeable pour des composés volatils. Le transfert des composés de la phase vapeur dans le système sol/eau/air dépend ainsi de leur répartition entre ces trois phases.

1.2.2. Lipophilie et solubilité dans l'eau

La propriété la plus importante contrôlant la pénétration et le transport des produits chimiques dans les plantes est la lipophilie, c'est-à-dire l'équilibre entre l'affinité des produits chimiques pour la phase aqueuse et pour la phase lipidique. La lipophilie détermine la facilité de transport à travers les membranes, bicouches lipidiques, des plantes et aussi détermine le potentiel de transfert à longue distance via le xylème ou le phloème. D'autres propriétés des produits chimiques, comme la présence de groupes fonctionnels particuliers ou le poids moléculaire (jusqu'à au moins 450), semblent avoir peu d'influence sur les propriétés de systémie. L'adsorption de composés sur les éléments solides des plantes, au niveau de la cuticule foliaire ou sur le cortex racinaire, limite aussi l'absorption et le transfert à longue distance et ce phénomène est aussi fonction de la lipophilie.

La lipophilie est généralement évaluée en utilisant le coefficient de partage octanol/eau, $\log K_{ow}$. La solubilité dans l'eau reflète généralement mal le comportement systémique en raison du passage au travers des membranes biologiques. Cependant, la lipophilie peut être estimée à partir de la solubilité dans l'eau par les équations suivantes (Briggs, 1981) :

- pour des liquides $\log WS = 0,84 - 1,18 \log K_{ow}$

- pour des solides $\log WS = 0,01 - \log K_{ow} - (0,01 T_m - 0,25)$

où WS représente la solubilité dans l'eau (mol/L) et T_m est le point de fusion en °C.

Les classes de produits chimiques organiques utilisés en agriculture ou retrouvés dans l'environnement comprennent une grande variété de structures et par conséquent couvrent une gamme variée et large de $\log K_{ow}$ (Figure I-3).

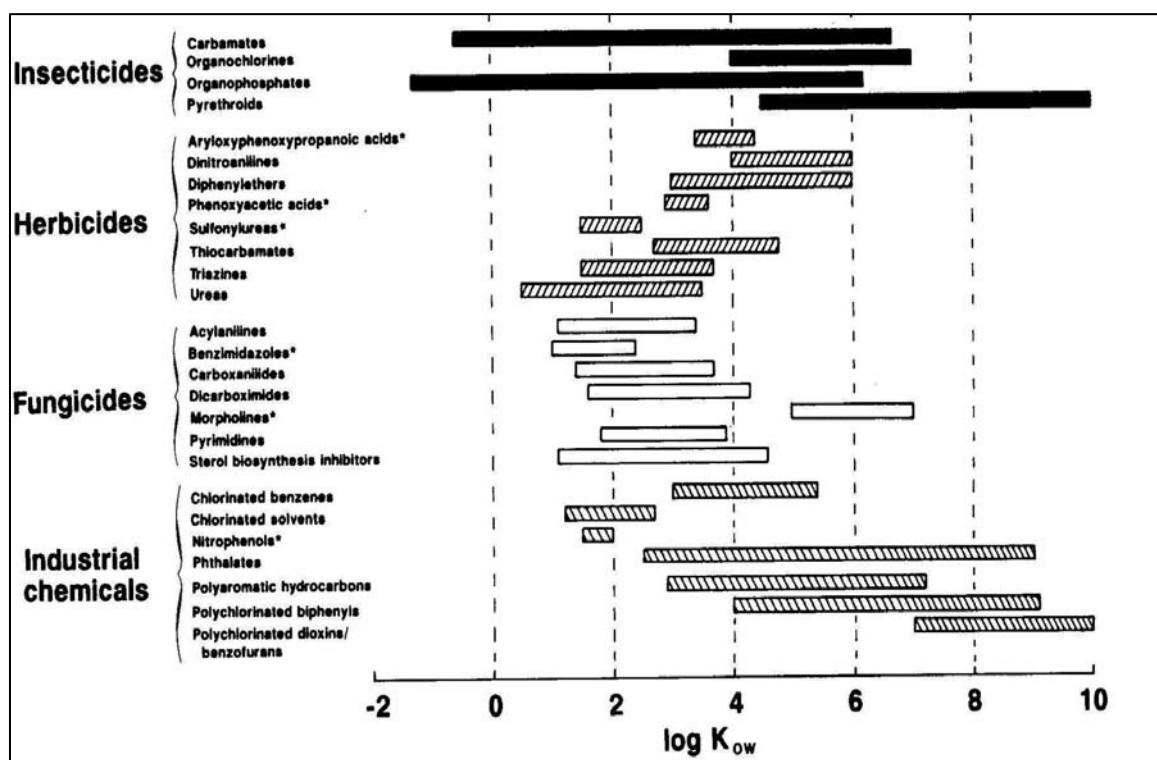


Figure I-3. Gamme de coefficients de partage octanol/eau (K_{ow}) pour diverses classes de pesticides et polluants industriels. Les astérisques indiquent les composés ionisables, les valeurs de K_{ow} sont indiquées pour la molécule non dissociée (d'après Trapp, S. et McFarlane, J. C., 1995).

1.2.3. Transfert de molécules ionisées à travers les membranes

Le pH du xylème est typiquement de 6,2- 6,5 celui du phloème de 8,0 des vacuoles de 5,5 et du cytoplasme de 7. Ces différences de pH n'influencent pas la distribution des composés non ionisés mais influencent fortement la distribution des composés ionisés.

Certains composés sont ionisés aux valeurs de pH mesurées dans le sol ou dans les cellules de plantes. Le pKa peut être considéré plus simplement comme le pH auquel 50% des groupes d'un acide ou d'une base sont ionisés. Comme pour les molécules non ionisables, c'est la fraction non ionisée des molécules qui traverse la membrane. Cependant, pour ces composés ionisables, la situation est plus complexe, particulièrement lorsqu'une membrane sépare des compartiments de la plante de pH différent (le plasmalemme, qui délimite le contenu des cellules de la paroi cellulaire pH~5-6 ; le tonoplaste, qui sépare le contenu vacuolaire pH~5.5, du cytoplasme pH~7). Dans de telles circonstances, une proportion différente de formes dissociées et non dissociées se répartit entre les deux compartiments. Ce mécanisme est connu sous le nom de piégeage d'acides (Bromilow, 1987 ; Raven, 1975). C'est le mode de pénétration des herbicides phénoxyalkanoïques, tel que le 2,4-D.

1.3. Systèmes d'étude

Les deux voies principales pour la pénétration d'un xénobiotique dans la plante sont les racines et les feuilles.

L'absorption par les racines de plantes entières et la translocation ultérieure par le courant de transpiration dans le xylème sont relativement faciles à étudier : le xénobiotique radiomarqué est généralement appliqué au niveau des racines dans une solution nutritive et les quantités accumulées dans les différentes parties de la plante sont mesurées après une période de temps donnée. Alternativement, la concentration d'un produit chimique dans le xylème peut être évaluée par la quantité de produit chimique accumulé pour un volume connu d'eau transpirée ; une correction doit être apportée si le composé est dégradé significativement au cours de la période d'essai. Pour certains composés lipophiles, le transport à partir du sol ou de la solution nutritive vers le feuillage peut se produire par la phase vapeur plutôt que par systémie.

L'étude de la translocation dans le phloème est plus difficile et se limite à quelques espèces où sont appliqués des modèles simples de distribution après application sur la surface des feuilles.

Pour beaucoup d'aspects, le ricin commun (*Ricinus communis*) est un système d'étude intéressant puisque les solutions de xénobiotiques peuvent être injectées dans le pétiole de la feuille mature et le phloème peut être collecté directement à partir d'incisions sur la tige. La distribution de produits chimiques organiques est classiquement mesurée par autoradiographie après application du composé radiomarké. Cette technique montre de façon détaillée l'accumulation de la radioactivité, mais possède le désavantage de montrer seulement la position du radio-isotope et de ne pas identifier le composé.

1.4. Absorption et transfert à partir du sol

1.4.1. Disponibilité dans le sol

Un xénobiotique présent dans le sol est soumis aux phénomènes de sorption sur les particules du sol et de pertes qui limitent la quantité de produit chimique disponible pour l'absorption par les plantes (Briggs, 1984). La dégradation biologique ou photochimique constitue la perte principale, bien que la volatilisation puisse être importante pour quelques composés qui ont une forte pression de vapeur. Les phénomènes de sorption, adsorption/désorption, sur les particules du sol sont principalement le fait de l'adsorption sur la matière organique du sol. L'adsorption d'un composé sur la matière organique peut être évaluée par la distribution entre le sol et l'eau (K_d). Elle est généralement proportionnelle à la lipophilie des composés et au taux de matière organique du sol. L'adsorption sur la matière organique (K_{om}) peut ainsi être estimée à partir du K_d par l'équation :

$$K_d = K_{om} \frac{\% \text{ de matière organique}}{100}$$

La valeur de K_{om} peut être évaluée à partir de celle de K_{ow} :

$$\log K_{om} = 0,52 \log K_{ow} + 0,62$$

L'absorption décroît proportionnellement avec des quantités croissantes de matière organique. Dans des sols avec un contenu en carbone organique de 1 à 5%, les produits chimiques lipophiles non ionisés, c'est-à-dire avec un $\log K_{ow} > 4$ seront fortement adsorbés, avec un $K_d > 10$, tandis que les produits chimiques modérément lipophiles, c'est-à-dire avec un K_{ow} entre 2 à 4, vont être modérément adsorbés, avec un K_d compris entre 1 et 10.

1.4.2. Absorption à partir du sol

Les xénobiotiques peuvent être absorbés par les racines soit par la phase vapeur soit par l'eau du sol, la proportion entre chaque itinéraire dépendant en grande partie des propriétés physico-chimiques du composé. L'équilibre de composés organiques volatils entre la phase vapeur et liquide est décrit selon la loi de Henry (Figure I-4). La constante (H') pour un produit chimique est représenté par le rapport entre la concentration de la vapeur saturée et la solubilité dans l'eau :

$$H' = T/273 * v.p. \cdot 10^{-5} / 22,4 \text{ W.S.}$$

où v.p. est la pression de vapeur (Pa) et W.S. est la solubilité dans l'eau (mol/L) mesurée à la température T (K). Les composés organiques avec une constante de Henry élevée auront ainsi une forte concentration dans la phase vapeur comparée à celle dans l'eau de sol et seront absorbés principalement via la phase vapeur. Ceux avec une constante faible seront absorbés par les racines à partir de la phase aqueuse et les composés avec une valeur intermédiaire seront absorbés par les deux voies.

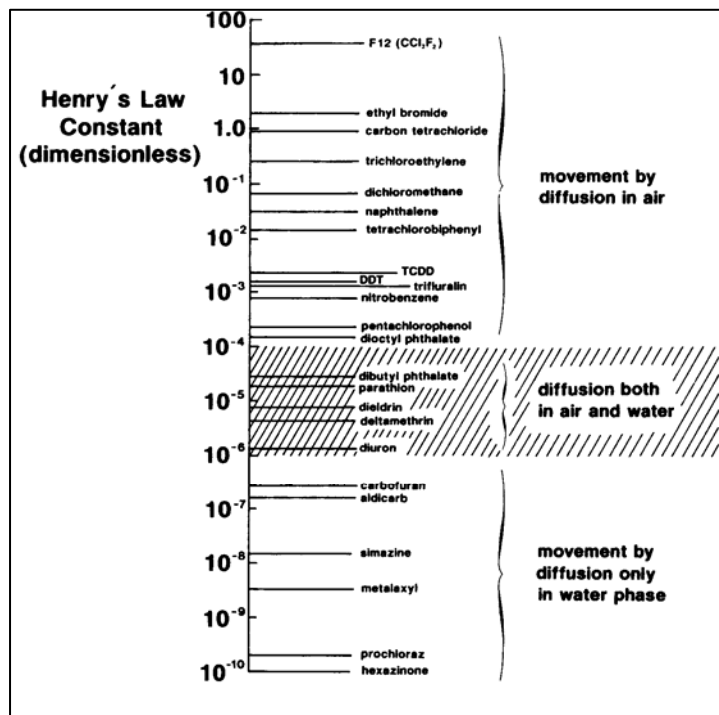


Figure I-4. Voies du mouvement des xénobiotiques dans les plantes après absorption par le sol déterminées par la constante de la loi de Henry.

L'efficacité d'absorption par les racines, quelle que soit la phase d'absorption vapeur ou liquide, peut être exprimée par la proportion entre la concentration d'un produit chimique dans les racines et la concentration de ce produit dans le milieu environnant. Lors de l'absorption par la phase aqueuse, cette proportion, appelée le facteur de concentration dans les racines (RCF) (Shone, 1974 ; Brigg, 1982) est défini comme suit :

$$\text{RCF} = \text{concentration dans des racines} / \text{concentration dans la solution externe}$$

Ce facteur ne définit que le taux retrouvé dans les racines mais ne préjuge ni du taux de transfert vers le sommet de la plante (translocation) ni des phénomènes d'adsorption sur les constituants racinaires.

1.4.3. Translocation des racines vers les parties aériennes

L'efficacité de transport dans les parties aériennes des racines, avec le flux de transpiration, est exprimée par le facteur de concentration dans le flux de transpiration (TSCF) (Shone, 1974 ; Briggs, 1982). Il est défini par le rapport suivant :

$$\text{TSCF} = \text{concentration dans la sève xylémienne} / \text{concentration dans la solution externe.}$$

La concentration dans le xylème ne pouvant pas être facilement mesurée, elle est évaluée habituellement par la mesure de la quantité de composé accumulé pour une quantité connue d'eau transpirée. Lorsque le composé est métabolisé au cours de la période de temps (t), le TSCF apparent doit être corrigé du taux de dégradation (k) du composé (Briggs, 1982) :

$$\text{TSCF corrigé} = (\text{TSCF apparent} \cdot t \cdot k) / [1 - \exp(-kt)]$$

Dans le cas de l'absorption passive, la valeur maximale pour le TSCF est par conséquent de 1,0 : le composé se déplace avec la même efficacité que l'eau.

Les composés ne peuvent pas se déplacer de la racine vers la partie aérienne uniquement par la voie apoplastique parce que celle-ci est bloquée au niveau de l'endoderme par les cadres de Caspary. A ce niveau, pour atteindre le système vasculaire et ainsi la partie aérienne, les composés doivent traverser la membrane plasmique des cellules endodermiques pour atteindre le xylème. Le TSCF mesure ainsi la capacité du composé considéré à le faire. L'adsorption sur le sol limitant l'absorption des xénobiotiques, la translocation par le xylème est réduite proportionnellement à l'augmentation du taux de matière organique dans le sol, l'absorption des composés lipophiles étant particulièrement affectée. C'est donc la concentration dans l'eau du sol qui doit être considéré et non la concentration dans le sol.

N'importe quel composé se déplaçant avec le flux de transpiration et qui atteint les parties aériennes, sans aucune perte, sera accumulé dans les sites où la transpiration est la plus grande, les feuilles matures et le pourtour des limbes. Cependant, il peut y avoir des pertes réversibles des produits chimiques non ionisés par adsorption sur les éléments solides des tiges et pour les acides faibles, il y a la possibilité du piégeage d'ions, y compris dans le phloème adjacent.

L'absorption et la translocation par des racines de soja de quelques fongicides, herbicides et d'un insecticide de différentes classes chimiques et couvrant une gamme variée de log K_{ow} , ont été étudiées (aclonifène 3,98, carbendazim 1,37, diméthoate 0,77, fénoxaprop 0,003, imazéthapyr 1,7, iprodione 3,5, linuron 3,0, métalaxyl 1,27, penconazole 3,6, simazine 1,93). L'efficacité de translocation a été évaluée par le facteur de concentration dans le courant de transpiration (TSCF) et un rapport non linéaire entre TSCF et le log K_{ow} a été observé selon le même type de relation qu'entre RCF et K_{ow} . Les valeurs de TSCF les plus faibles ont été obtenues avec des produits chimiques ayant des valeurs de log K_{ow} en-dessous aussi bien qu'au-dessus de 3 (Sicbaldi, 1997).

Toutefois, malgré leur forte lipophilie, des fongicides de type morpholine sont systémiques. Un tel transport peut s'expliquer par leur protonation ($pK_a \sim 7,5$) au pH des compartiments des plantes pour rendre le cation plus polaire. Ainsi, l'absorption et le transfert chez l'orge de deux morpholines, le dodémorphe et le tridémorphe ont été examinés à partir de solutions de différents pH. A pH = 5, l'absorption et le transport étaient faibles, mais ont augmenté d'environ deux ordres d'amplitude à pH = 8. Au contraire, les pesticides non ionisés de log $K_{ow} > 5$ ne sont pas transférés des racines vers les tiges (Chamberlain et Bromilow, 1998).

2. Absorption et transfert à partir des feuilles

2.1. Absorption par la cuticule

Les surfaces extérieures des feuilles et de la plupart des fruits et des tiges sont couvertes par une couche cireuse, ou cuticule, qui sert de barrière à la perte d'eau par la plante ; la cuticule ralentit aussi l'absorption des xénobiotiques par le feuillage de plante. Ces effets sur l'absorption de pesticides varient considérablement suivant les espèces et peuvent être réduits par l'utilisation d'adjuvants appropriés. Généralement, les composés de lipophilie intermédiaire, log K_{ow} entre 1 et 3, sont absorbés plus facilement que des composés se situant en dehors de cette gamme.

2.2. Transfert dans le xylème

Le passage d'un produit chimique à travers la cuticule de la plante peut limiter la quantité disponible pour le transport dans la plante ; cependant, le transfert de xénobiotiques dans le xylème après absorption par les feuilles obéit aux mêmes équations que celles établies après absorption par les racines. Néanmoins, les composés absorbés par les racines doivent pénétrer dans le symplasme au niveau de l'endoderme pour pouvoir ensuite se déplacer vers les parties aériennes par le xylème et cela réduit la translocation des composés les plus polaires, qui ne traversent pas les membranes cytoplasmiques très facilement. Les composés appliqués sur les parties aériennes ne doivent pas traverser cette membrane pour entrer dans le xylème. Par contre, ils doivent franchir la cuticule plus ou moins fortement cireuse. Mais sur celle-ci apparaissent en fonction des plantes ou de leur âges, des pores hydrophiles, tel que des fractures dans la couche cireuse, qui permet le passage de molécules plus hydrophiles. Ainsi, cela permet un transport plus efficace de composés polaires et de lipophilie intermédiaire qui peuvent traverser la cuticule. Le transport des composés lipophiles est limité comme précédemment par leur adsorption sur des éléments solides des plantes et lors d'une application foliaire, cela inclut la cuticule elle-même, qui adsorbe fortement les composés possédant une valeur élevée de K_{ow} .

2.3. Transfert dans le phloème

Le mécanisme de transport des composés endogènes et des xénobiotiques dans le phloème est depuis longtemps un sujet de discussion. Contrairement au xylème, les vaisseaux phloémiens sont constitués de cellules vivantes et de ce fait les produits doivent pour pénétrer dans le courant phloémien traverser une membrane pas très différente de celle de l'endoderme (Figure I-5). Pour les molécules endogènes, la différence de pression osmotique créée par leurs fortes concentrations dans les cellules mésophyles où ils sont synthétiser entraîne l'eau et les solutés (sucres, acides aminés) dans les tubes criblés vers les zones d'utilisation ou "puits". Pour les composés xénobiotiques, les composés mobiles dans le xylème après absorption par les racines et qui ont donc déjà franchit des membranes biologiques doivent être capables de pénétrer dans le phloème.

La translocation d'un composé dans le phloème dépend de deux mécanismes. Le premier est l'absorption du composé par les tubes criblés du phloème à partir des tissus environnants, le deuxième est le maintien du composé dans le phloème pendant la translocation. Les composés neutres très polaires ne traversent pas suffisamment les membranes pour être capables d'entrer dans les vaisseaux de phloème et ne sont pas transférés. Les composés neutres de lipophilie intermédiaire (K_{ow} de 1 à 3), qui traversent les membranes très aisément, peuvent entrer dans le phloème, mais ressortent immédiatement dans le volume plus grand du xylème qui possède de plus un débit plus élevé.

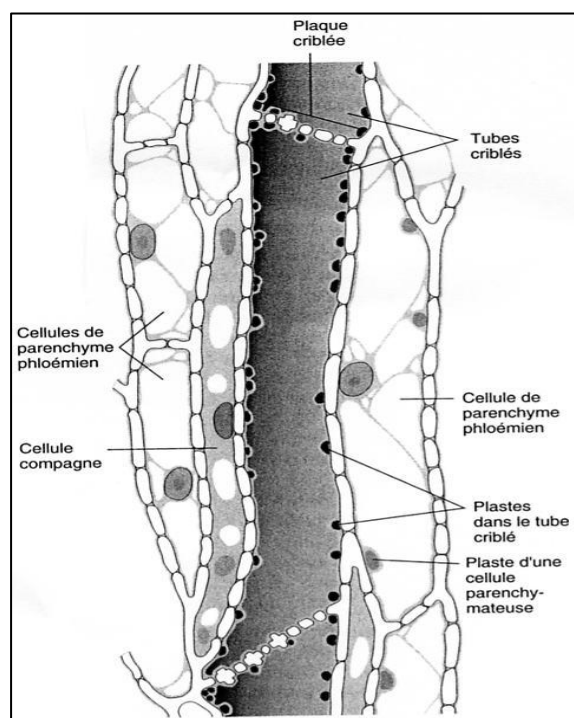


Figure I-5. Représentation des tissus phloémiens d'une tige de tabac (d'après Hopkins, W. G., 1999).

Les produits chimiques neutres de perméabilité intermédiaire tels que l'oxamyl et l'aldoxycarbe, avec des valeurs de $\log K_{ow}$ égales à -0,47 et -0,57, respectivement, peuvent être transportés dans le phloème (Bromilow, 1987) car ils peuvent entrer dans celui-ci au niveau des zones de fortes concentrations, près du site d'application, mais sont trop polaires pour ressortir facilement du phloème.

De tels modèles de transport ont été explorés en termes de taux de pénétration des molécules non ionisées dans les membranes ; ce processus est une fonction de la lipophilicité du pesticide, avec les composés de lipophilicité intermédiaire qui sont les plus capables de traverser les membranes de la plante (Briggs et Bromilow, 1982 ; Kleier, 1988).

Le transport d'acides faibles a aussi été étudié, de nombreux herbicides ayant cette fonctionnalité. A nouveau, le mouvement à travers les membranes contrôle le mode de transport et les acides faibles ont tendance à être accumulés dans les compartiments de la plante de pH plus élevé comme le cytoplasme et le phloème, la forme dissociée se trouvant alors en plus forte concentration dans ces compartiments (Briggs, 1987 ; Bromilow, 1987).

Ce piégeage d'ions peut être évalué par l'équation de Nernst (Bromilow, 1987 ; Raven, 1975). Cela exige la connaissance des acidités des compartiments de plante et de n'importe quelle solution externe.

Les propriétés de systémie des bases ont été moins étudiées. Quelques herbicides comme le paraquat sont des amines quaternaires sont absorbés et transportés dans les plantes, mais un tel transport est très limité en raison de leur phytotoxicité rapide développée à la lumière (Price, 1979). Après l'application des sels tels que le 1-chlorure méthylpyridinium sur des feuilles de blé, ils ont été transférés tant dans xylème que dans phloème. Hsu et al. (1988) ont étudié le transport d'une série d'amines quaternaires dans le phloème et l'ont relié à leur lipophilicité. Plusieurs fongicides sont des bases d'amine, bases faibles comme le carbendazim ($pK_a = 4,2$) ou bases plus fortes comme le tridémorphe ($pK_a = 7,4$) et la dodine ($pK_a \sim 12$). Ces composés étaient parmi les premiers fongicides systémiques. Le tridémorphe est un exemple de fongicides de type morpholine dont les propriétés systémiques sont étonnantes étant donné la forte lipophilie de ces composés ; clairement l'espèce protonée plus polaire doit être impliquée dans un tel transport, les molécules non ionisées d'une telle lipophilie n'étant généralement pas systémiques. En outre, ils ont montré que le dodémorphe et le tridémorphe sont absorbés par les racines de plantes d'orge et transférés vers la partie aérienne avec une efficacité remarquable, l'assimilation étant dépendante du pH de la solution nutritive mais effective aux pH élevés (Chamberlain, 1998).

Un certain nombre de modèles d'absorption des pesticides par les plantes ont été développés (Trapp, 1995 ; Hung et Mackay, 1997 ; Trapp, 1991 ; Rieder, 1995; Paterson, 1995; Trapp et Matthies, 1995 ; Satchivi, 2000) pour élucider leur mécanisme de distribution et déterminer les taux de résidus dans les récoltes. Le concept majeur adopté dans ces modèles est la théorie basée sur la partition. Le mécanisme général d'absorption par la plante est dirigé par la concentration d'eau extérieure et consiste en plusieurs séries d'absorption dans la plante et l'eau externe.

3. Transfert des pesticides vers les fruits

La majorité des données sur le transfert des xénobiotiques dans les plantes concerne la partie végétative de la plante. Il existe peu de données sur le transfert des pesticides vers les parties reproductives. Pour les fruits et les graines en particulier, c'est le plus souvent une mesure de la contamination directe du fruit après traitement par les pesticides qui est effectuée.

3.1. Modèles

Comme pour les parties végétatives (en dehors de la contamination directe), les trois facteurs principaux qui affectent la quantité résiduelle dans le fruit sont le transfert du pesticide vers la fruit avec le courant de transpiration par le xylème (1), le transfert vers le fruit par le phloème (2) et la perte par métabolisme/dégradation (3). La validation du modèle développé par Fujisawa (2002) a été conduite en utilisant six pesticides : le furametpyr, le diéthofencarbe, la procymidone, le diclocymet, le diniconazole-M et le pyriproxifène, marqués uniformément au carbone 14 sur le noyau phénolique. Des plantes de soja (*Glycine max* Merr.) et d'épinard (*Spinacia oleracea* L.) ont été semées dans un sol et cultivées dans une serre à 22 °C pendant un mois. Le soja a également été cultivé pendant trois mois pour obtenir des plantes au stade graines qui ont été utilisées pour la validation du modèle de transfert vers la graine. Quelques exemples de translocation de pesticides vers les fruits ou les graines vont être développés ci-après.

3.2. Exemples

La composition en résidus de chlordane dans le sol, les compartiments végétatifs et les fruits a été examinée chez la courgette, après contamination du sol par le chlordane. Les quantités retrouvées diffèrent suivant les tissus depuis un maximum dans les racines jusqu'à un minimum dans les fruits.

En plus de ce gradient de concentrations dans les tissus, les résultats indiquent que des mécanismes abiotiques dominent le transport du chlordane, c'est-à-dire un transport par le xylème. L'absorption du chlordane par les racines est ainsi plus rapide que la translocation dans les tissus aériens (White et al., 2002). D'autres membres de la famille des cucurbitacées sont connus pour absorber et transporter efficacement le chlordane (Mattina et al., 2000). Lorsque les plants de courgette (*Cucurbita Pepo* L.) sont exposés à une contamination du chlordane par voie aérienne, des résidus sont aussi détectés dans tous les tissus examinés : racines, tiges, feuilles et fruits (Lee et al., 2003). Par ailleurs, ces deux études illustrent les différences entre les deux voies d'absorption pour un produit organique persistant (POP) et sa translocation ultérieure dans les tissus de la plante. Des graines de soja traitées par le carbofuran marqué au carbone 14 contiennent environ 1% de la radioactivité appliquée. L'analyse des résidus a montré la présence de produits libres, le carbofuran et son phénol, dans l'huile et de conjugués au glucose dans l'extrait méthanolique. L'application foliaire a mené à l'apparition de radioactivité dans les cosses et dans les graines. Les résidus radioactifs totaux dans les cosses s'élèvent à 1,3% de la dose appliquée dont 80% ont été associés aux graines (Zayed et al., 1998).

La distribution de l'imidaclopride marqué au carbone 14 sur le cycle imidazolidine a été étudiée chez le tournesol traité par le Gaucho® au stade semence (1 mg/graine). Les plantes ont absorbé moins de 10% de la radioactivité dont 75% ont été retrouvés dans les cotylédons. Les concentrations des feuilles supérieures étaient 20 fois plus faibles que dans les premières feuilles. Dans le pollen, les concentrations d'imidaclopride étaient de l'ordre de 13 ng g⁻¹. Ainsi, des résidus du traitement des graines par l'imidaclopride ont contaminé le pollen, impliquant sa translocation dans la plante. Pour expliquer ces résultats, certains auteurs ont suggéré un mécanisme de remobilisation : l'imidaclopride ou ses résidus, accumulés dans des feuilles inférieures pendant l'étape végétative, pourraient être transférés vers la partie supérieure des plantes pendant l'étape de reproduction, de la floraison ou de la formation des graines (Bonmatin et al., 2003).

4. Métabolisme des xénobiotiques

La plante ne possédant pas d'organe excréteur, le pesticide après pénétration reste dans la plante. Toutefois, il subit un certain nombre de transformations qui entraînent une baisse de sa concentration. La compréhension du métabolisme des pesticides chez les plantes est nécessaire pour le développement du pesticide, pour son utilisation sûre et efficace, aussi bien que pour développer des stratégies de dépollution du pesticide pour le sol et l'eau contaminés. Le devenir métabolique des pesticides est dépendant de l'espèce de plante, des caractéristiques du pesticide (lipophilie, pKa, Kow, etc.) et des réactions biologiques et chimiques.

4.1. Les différentes phases

Les plantes métabolisent les xénobiotiques le plus souvent en produits plus polaires et plus solubles et en résidus liés insolubles. Le métabolisme chez les plantes ressemble à celui des animaux selon un certain nombre de critères ce qui a conduit Sandermann (1977, 1992) à considérer la cellule végétale comme un foie vert, « green liver ». (Figure I-6). Cette similitude est reflétée par la large gamme de substrats métaboliques. Comme le métabolisme dans le foie, le métabolisme chez la plante peut être divisé en trois phases et décrit par une série de réactions partielles (Trapp et Farlane, 1995) (Figure I-7)

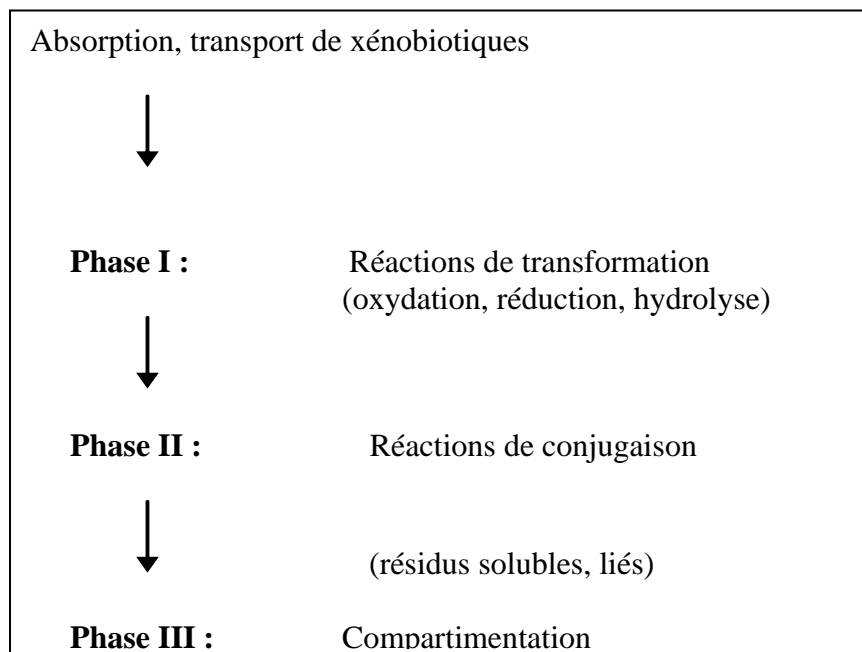


Figure I-6. Métabolisme des xénobiotiques dans la plante (d'après Sandermann, H., 1992).

4.1.1. Phase I

La phase I permet généralement la conversion des produits chimiques biologiquement actifs en produits moins efficaces ou moins toxiques, principalement par des réactions d'hydrolyse et d'oxydation. De temps à autre, les réactions conduisent à des métabolites plus toxiques (bioactivation) (Casida et Lykken, 1969 ; Menzer, 1973 ; Lamoureux et Frear, 1979 ; Cole, 1983). Ainsi la phase I consiste en des réactions de transformation des molécules qui introduisent des groupes fonctionnels, -OH, -NH₂, -SH, sur ces composés.

L'oxydation est la réaction la plus fréquemment observée : hydroxylation de noyaux aromatiques, de chaînes alkyles, d'atomes d'azote ou de soufre comme par exemple l'hydroxylation du groupe N-alkyl menant au conjugué correspondant et/ou la N-déalkylation oxydative ou l'hydrolyse pour former des dérivés de l'acide carbamique (Schlagbauer et Schaglabauer, 1972 ; Cole, 1983 ; Vonk, 1983 ; Edwards et McMinn, 1985 ; Katagi, 2000).

L'époxydation, aussi bien que les N-ou O-déalkylation sont les réactions d'oxydation majeures. Les réactions de réduction sont moins communes et ont été trouvées pour des certains composés nitroaromatiques. Des réactions d'hydrolyse de la fonction ester d'un acide carboxylique peuvent se produire, par exemple avec les organophosphorés, les carbamates et les anilides.

Par exemple, l'hydrolyse de la moitié ester, la O-déalkylation et la désulfuration oxydative de la moitié P=S à P=O (oxon) sont les réactions majeures pour le fénitrothion chez le riz et la pomme (Hosokawa and Miyamoto, 1974), le parathion chez l'épinard et le haricot (Edouard and McMinn, 1985) et le bromophos chez la tomate (Siasni, 1969 ; Katagi, 2000). Elles sont importantes en agriculture car elles permettent l'activation de certains pesticides.

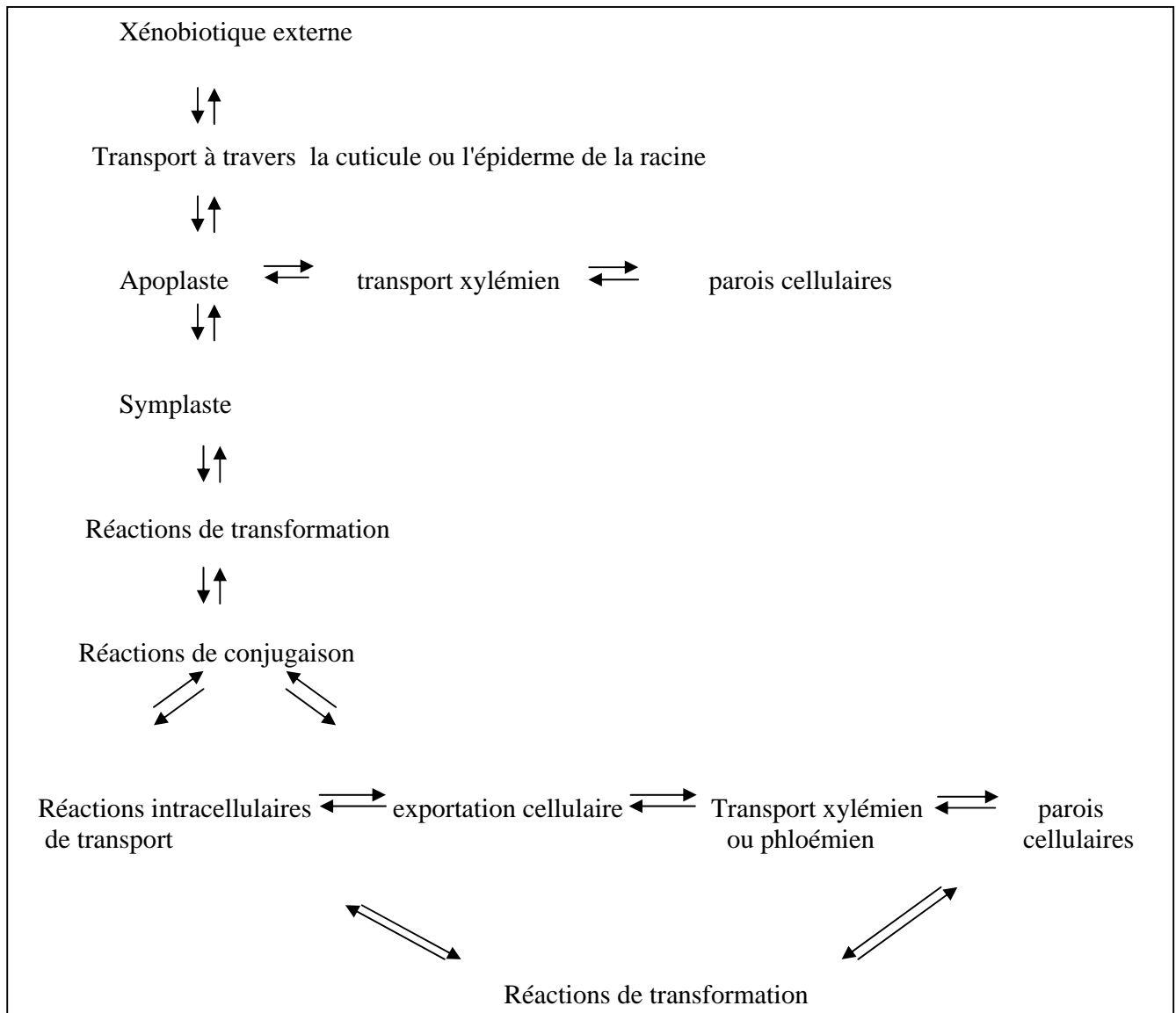


Figure I-7. Modèle cinétique simple du métabolisme des xénobiotiques chez les plantes (d'après Trapp, S. et McFarlane, J. C., 1995)

4.1.2. Phase II

Cette phase consiste en la fixation d'une ou plusieurs molécules endogènes, sucre, acide aminé, sur le pesticide et plus généralement sur le métabolite primaire. Les plantes supérieures sont capables de conjuguer une gamme diverse de pesticides et d'autres produits chimiques environnementaux avec les constituants naturels des plantes. Les produits majeurs impliqués dans la conjugaison sont le glucose, le glutathion, l'acide malonique et les acides aminés. La conjugaison est un mécanisme régulateur naturel qui permet à la plante d'augmenter la solubilité dans l'eau de composés potentiellement toxiques, réduisant ainsi leur réactivité et toxicité. Pour la plante, cela permet en l'absence d'organe excréteur, de mettre en réserve le xénobiotique dans le compartiment vacuolaire.

La glycosylation est la conjugaison la plus communément décrite. C'est la voie la plus fréquente lorsque des groupes fonctionnels tels que -OH, -NH, -SH ou -COOH sont présents, soit déjà existants sur la molécule parente, soit créés au cours de la phase I. Le glucose est le sucre le plus fréquemment retrouvé dans ces réactions de conjugaison. La phase II peut être subdivisée selon la nature du conjugué formé, soluble ou insoluble. Les phénols et les alcools sont généralement conjugués au β -O-*D*-glucose. Les xénobiotiques contenant un groupe amine primaire ou secondaire peuvent être métabolisés en N-glucosides. Des esters de glucose conjugués sont formés avec des composés contenant des groupes acyles. Une autre réaction de conjugaison importante, la conjugaison au glutathion implique généralement le déplacement de groupes halogénés ou nitrés de la molécule parent ou la scission de la molécule comme dans le cas des herbicides diphényléthers. Dans la réaction avec le glutathion, la phase I et II sont réalisées en une seule étape.

4.1.3. Phase III

Une différence importante entre les systèmes métaboliques de la plante et de l'animal réside dans la phase III. Les conjugués sont principalement excrétés chez les animaux tandis qu'ils sont stockés dans les tissus des plantes. Les conjugués solubles ou extractibles sont stockés le plus souvent dans la vacuole. Par exemple, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) est hydroxylé au cours de la phase I, conjugué au glucose ou à des acides aminés dans la phase II et finalement compartimenté dans la vacuole dans la phase III.

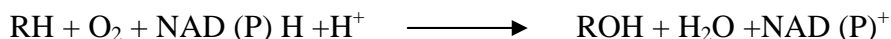
Les conjugués peuvent aussi être incorporés dans les polymères de la cellule et ne sont plus solubles dans les solvants généralement utilisés, ce sont les résidus insolubles, inextractibles ou liés. Certains composés aromatiques ou hétéroaromatiques comportant des fonctions hydroxyle, acyle, amine ou sulfhydryle sont déposés dans la lignine ou dans d'autres composants de la paroi cellulaire. La lignine, constituant majeur de la paroi, est le site préférentiel de la fixation de ces composés insolubles (Sandermann, 1987 ; Komosa, 1995).

4.2. Enzymes impliquées dans le métabolisme

Beaucoup des réactions d'oxydation sont catalysées par des enzymes oxydatives, par exemple, les monooxygénases à cytochrome P-450 (cyt P-450), les peroxydases et les polyphénol oxydases.

4.2.1. Monooxygénases à cytochrome P-450

Les enzymes oxydatives les plus largement étudiées et les plus importantes chez les plantes et les animaux sont les enzymes à cyt P-450 ou P-450 dépendantes (Barrett, 2000). Les cyt P-450 sont des protéines membranaires qui catalysent généralement des réactions d'hydroxylation, selon le schéma suivant :



Cependant, les P-450s catalysent d'autres réactions incluant la déshydratation, la dimérisation, la désamination, la déshydrogénation, la déalkylation d'hétéroatomes, l'époxydation, la réduction et le clivage de liaisons C-C et C=N. Les cyt P-450 sont divisés en trois classes selon le cofacteur : flavine adénine dinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN) ou nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Les premiers travaux sur le métabolisme réalisé par les cyt P-450 chez les plantes ont porté sur des herbicides de la famille des phénylurées, en particulier le chlortoluron.

De jeunes plants de blé exposés au chlortoluron et à des inhibiteurs des P-450 (1-aminobenzotriazole) ont été plus atteints que les plantes traitées avec le chlortoluron seul (Cabanne et al., 1987 ; Gaillardon et al., 1985), démontrant la désactivation de l'herbicide par une réaction d'oxydation dépendante des cyt P-450. Des résultats semblables ont été observés en utilisant des cultures cellulaires, où un inhibiteur P450, le tetcyclacis, a réduit le métabolisme du chlortoluron (Canivenc et al., 1989). Des preuves directes de la médiation du métabolisme par des cyt P450 ont été obtenues par des expérimentations avec des préparations de microsomes (Van Aerd, 2003).

4.2.2. Peroxydases, phénol oxydases et oxydo-réductases

Les plantes produisent une large gamme d'autres enzymes d'oxydation que les cyt P-450, peroxydases, polyphénol oxydases, laccases et tyrosinases, qui catalyse en particulier la polymérisation d'anilines et de phénols. La transformation de pesticides par des peroxydases conduit au même type de métabolite que les cyt P-450, incluant la décarboxylation, l'oxydation d'atome de soufre, la N-déméthylation, l'hydroxylation et l'oxydation de groupes méthyles aromatiques (Lamoureux et Frear, 1979).

Les peroxydases fonctionnent souvent au niveau de la phase III, par exemple, lors de la formation des résidus liés. Dans ce cas toutefois, l'enzyme n'a pas une action directe sur le pesticide mais entraîne la formation de radicaux libres sur la lignine qui conduisent à une copolymérisation du pesticide avec les monolignols précurseurs de la lignine.

4.2.3. Hydrolases

L'hydrolyse d'esters de pesticides par les plantes a été largement étudiée (Hoagland et al., 2001 ; Zablotowicz et al., 1997). L'hydrolyse d'ester est généralement effectuée par des estérases et dans une moindre mesure par des lipases et des protéases. Ces enzymes hydrolytiques cassent les liaisons d'un substrat en ajoutant un hydrogène ou un hydroxyle provenant de l'eau à chaque produit. Les enzymes hydrolytiques sont capables de métaboliser une large variété de substrats, particulièrement ceux contenant une fonction amide, carbamate, ou ester. Ces enzymes peuvent être intra- ou extracellulaires et fonctionner dans des conditions aérobies ou anaérobies. Les estérases des plantes ont un motif caractéristique dans leur structure GLY-X-SER-X-GLY (Brenner, 1988).

Chez plusieurs espèce de plantes, des expériences avec des analogues du propanil ont montré que généralement celui-ci était le substrat préféré de l'acylamidase (Frear, 1968 ; Hoagland 1975, 1978 ; Hoagland et Graf, 1972). Des interactions synergiques peuvent arriver quand le propanil est mélangé avec certains produits chimiques agricoles tels que des carbamates, des insecticides organophosphorés et les herbicides anilophos, pendiméthaline et piperophos (Frear, 1968 ; Matsunaka, 1968 ; Norsworthy et al., 1999). La synergie du propanil et de l'insecticide carbaryl est le résultat d'une inhibition compétitive avec les aryl acylamidases (Hudgins, 1966 ; Frear, 1968).

4.2.4. Nitroréductases

Généralement, les composés nitroaromatiques sont transformés différemment selon les plantes. Par exemple, le métabolite majeur de la trifluraline chez l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) est N-dépropylé, tandis que chez la patate douce (*Ipomoea batatas* L.), le dérivé monoaminé est prédominant (Probst et Tepe, 1969). Chez les plantes, la conjugaison au glutathion du pentachloronitrobenzène se produit de façon concomitante au déplacement d'un groupement chlorure ou nitro (Van Aerd et al., 2003 ; Rusness, 1980 ; Rusness et Lamoureux, 1980). Les nitroréductases sont des flavoprotéines qui utilisent le NAD (P) H et la FMN comme cofacteurs.

5. Les insecticides chloronicotinyles

La famille chimique des chloronicotinyles est relativement nouvelle et semble aujourd'hui prendre de plus en plus d'importance. Elle représente à ce jour 10% du marché des insecticides au niveau mondial et serait susceptible de devenir la famille phare dans les prochaines années en matière de lutte contre les ravageurs en agriculture. Cette famille contient un certain nombre d'insecticides systémiques dont l'imidaclopride, l'acétamipride et le thiaméthoxam. Ces substances sont transportées dans toute la plante par le flux de transpiration et comportent un certain degré d'activité résiduelle après l'application. Les produits actuellement disponibles varient par leur solubilité dans l'eau, ce qui affecte leur absorption par les plantes.

Les chloronicotinyles ont un mode d'action différent des autres insecticides organophosphorés, carbamates ou pyréthroïdes qui doivent leur toxicité l'inhibition des cholinestérases, responsables de l'inactivation de l'acétylcholine aux jonctions neuromusculaires et de certaines synapses dans les systèmes nerveux centraux et périphériques.

Les chloronicotinyles entraînent la mort des parasites d'une manière similaire au produit naturel, la nicotine, par leur action sur le système nerveux central en provoquant le blocage irréversible des récepteurs cholinergiques post-synaptiques de l'acétylcholine. Ces insecticides perturbent ainsi la transmission nerveuse chez l'insecte.

5.1. Imidaclopride

L'imidaclopride (Figure I-8) est le premier composé de cette nouvelle classe d'insecticides chimiques (Elbert et al., 1990 ; Bayer AG et Nihon Tokushu Noyaku Seizo, 1991). On le retrouve dans de nombreuses formulations commerciales, Admire[®], Confidor[®], Gaucho[®], Ministre[®], Provado[®] et Marathon[®] (Meister, 1994), appliqué à 25-100 g/ha pour l'application foliaire, et à 50-175 g/100 kg pour la plupart des traitements de semences et de 350-700 g/100 kg pour traiter les graines de coton. En outre, elle est utilisée pour lutter contre les puces chez les animaux domestiques (Tomlin, 2007).

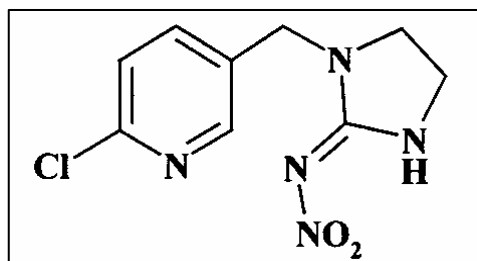


Figure I-8. Structure de l'imidaclopride ou 1-(6-chloro-3-pyridylméthyle)-N-nitroimidazolidine-2-ylidèneamine.

L'imidaclopride est un des insecticides systémiques les plus utilisés dans le monde dans les champs et en horticulture. Il est souvent utilisé comme traitement de semence, particulièrement pour le maïs, le tournesol et le colza.

Il est recommandé en traitements foliaires contre les insectes suceurs comprenant les cicadelles, les pucerons, les thrips, les mouches blanches, ou en traitement de sol contre les termites, les insectes du gazon et du sol, quelques coléoptères dont les taupins, il est utilisé sur le riz, le maïs, la pomme de terre, les légumes, la betterave sucrière, les fruits, le coton, le houblon et le gazon. Il est transporté principalement dans le xylème tant dans chez les mono- que chez les dicotylédones (Stein-Donnecke, 1992 Tröltzsch, 1994).

Les propriétés systémiques de l'imidaclopride permettent sa distribution dans la jeune plante en croissance après traitement du sol ou de la semence. Après application par pulvérisation, la plupart des résidus sur la surface des feuilles consiste en composé parental inchangé, tandis que l'imidaclopride appliqué dans le sol ou par enrobage de semence est métabolisé plus ou moins complètement, selon l'espèce et la durée d'exposition (Araki, 1994).

L'imidaclopride est classé par l'U.S. Environmental Protection Agency dans la classe de toxicité II et agent de la classe III, et doit être marqué avec le signal «avertir» ou «attention» (Meister, 1994). La tolérance pour les résidus d'imidaclopride et de ses métabolites dans l'alimentation s'étend de 0,02 ppm dans les aubergines à 0,5 ppm dans le houblon (U.S., 1995). La toxicité de l'imidaclopride a été évaluée par le JMPR en 2001 et 2002 où une DJA de 0,06 mg/kg poids corporel par jour et un ARfD 0,4 mg/kg poids corporel par jour ont été établis. Un certain nombre de niveaux de résidus maximaux ont également été déterminé. Les résidus ont été définis comme la somme de l'imidaclopride et de ses métabolites contenant la moitié 6-chloropyridinyle dans des buts d'évaluation de consommation tant réglementaires que diététiques (Pesticide residues in food, 2006).

5.1.1. Propriétés physico- chimiques de l'imidaclopride

Les propriétés sont rassemblées dans le Tableau I-1.

5.1.2. Effets toxicologiques

5.1.2.1. Toxicité aiguë

L'imidaclopride est modérément toxique, la LD50 par voie orale est de 450 mg/kg de poids corporel chez le rat (Meister, 1995) et de 131 mg/kg chez la souris (Kidd et James, 1994). La LD50 chez le rat par voie cutanée est >5 000 mg/kg après 24 heures. Il est considéré non-irritant pour les yeux et la peau (lapins), et sans effet pour des cobayes (Kidd et James, 1994).

Concernant la toxicité d'inhalation aiguë chez le rat, la LC50 aéroportée de l'imidaclopride est $> 69 \text{ mg/m}^3$ d'air sous forme d'aérosol, et $> 5323 \text{ mg/m}^3$ d'air sous forme de poussière. Ces valeurs représentent les concentrations auxquelles les symptômes d'empoisonnement aéroportés possibles sont maximaux (Kidd et James, 1994).

Bien qu'aucun empoisonnement humain n'ait été rapporté dans la littérature, les signes et les symptômes attendus d'un empoisonnement seraient semblables aux signes et aux symptômes provoqués par la nicotine comme la fatigue, les contractures, les crampes et la faiblesse des muscles, comprenant ceux nécessaires à la respiration.

5.1.2.2. Toxicité chronique

Chez le rat, la thyroïde est particulièrement sensible à l'imidaclopride. Des lésions de cette glande sont provoquées par des doses à partir de 17 mg/kg de poids corporel par jour chez les mâles. Des doses légèrement plus élevées, 25 mg/kg par jour, ont réduit le gain de poids chez les femelles. A des doses plus élevées, 100 mg/kg par jour, les effets incluent l'atrophie de la rétine chez les femelles.

5.1.2.3. Effets mutagéniques

L'imidaclopride est faiblement mutagénique. Sur 23 analyses de tests de mutagénicité en laboratoire, seulement deux ont montré des effets positifs : des changements sur les chromosomes de lymphocytes humains et une génotoxicité sur les cellules chinoises d'ovaire de hamster.

5.1.2.4. Effets sur la reproduction

Une étude sur la reproduction de trois générations de rats, alimentés jusqu'à 700 ppm d'imidaclopride par minute, a entraîné comme conséquence un NOEL de 100 ppm par minute (équivalent à 8 mg/kg/jour), basé sur la diminution du poids corporel de chiots observé au niveau d'une dose de 250 ppm par minute.

5.1.2.5. Effets tératogènes

Une étude de toxicité développementale chez les rats alimentés par sonde gastrique jusqu'à 100 mg/kg/jour les jours 6 à 16 de gestation a eu comme conséquence un NOEL de 30 mg/kg/jour (basé sur des anomalies squelettiques observées à la dose la plus élevée de 100 mg/kg/jour) (Pike et Reed, 1993). Une étude de toxicité développementale chez des lapins alimentés par sonde gastrique avec des doses d'imidaclopride pendant les jours 6 à 19 de gestation, a eu comme conséquence un NOEL de 24 mg/kg/jour basé sur la diminution du poids corporel et les anomalies squelettiques observées à 72 mg/kg/jour (la dose la plus élevée) (Federal Register 1995).

5.1.2.6. Effets cancérogènes

Il n'y a aucun effet cancérogène dans une étude de deux ans de cancérogénicité chez les rats alimentés jusqu'à 1 800 ppm d'imidaclopride (USA, 1995).

5.1.2.7. Effet chez l'abeille

L'imidaclopride peut se révéler toxique pour l'abeille par contact direct mais il ne présente pas de risque quand il est employé comme traitement de graine ou s'il n'est pas utilisé pendant la floraison (Tomlin, 2007).

PARAMETRE	VALEUR
Aspect	cristaux sans couleur avec une odeur caractéristique faible
Nom chimique	1-(6-chloro-3-pyridylméthyle)-N-nitroimidazolidine-2-ylidèneamine,
Poids moléculaire	255,7
Solubilité dans l'eau	0,61 g L ⁻¹ (20 °C)
Solubilité dans d'autres solvants	dichlorométhane 50,0–100,0 g L ⁻¹ ; isopropanol 1,0 g L ⁻¹ ; toluène 0,5-1,0 g L ⁻¹ ; n-hexane < 0,1 g L ⁻¹ ; eau 0,061 g 100mL ⁻¹
Point de fusion	136,4 °C (forme en cristal 2) - 143,8 °C (forme en cristal 1)
Pression de vapeur	4.10 ⁻⁷ mPa (20 °C)
Henry	2.10 ⁻¹⁰ Pa m ³ mole ⁻¹
Coefficient de partage carbone organique /eau	247 cm ³ /g. Ce paramètre, noté K _{oc} , représente le potentiel de rétention de cette substance active sur la matière organique du sol.
Durée de demi-vie	180 jours. Ce paramètre, noté DT50 , représente le potentiel de dégradation de cette substance active, et sa vitesse de dégradation dans le sol.
Coefficient de partage octanol/eau	0,57. Ce paramètre est noté log Kow
LD50 rat	450 mg/kg
CL50 poisson	> 82 mg L ⁻¹
CL50 daphnies	85 mg L ⁻¹
CL50 algues	> 9 mg L ⁻¹
DJA	0,06 mg/kg/j

Tableau I-1. Propriétés physico-chimiques de l'imidaclopride.

5.1.3. Métabolisme de l'imidaclopride

Le métabolisme de l'imidaclopride a été examiné dans des tomates : les fruits immatures de deux plantes sous serre ont été pulvérisés avec une solution de 0,2% d'une formulation 25 WP (Draeger et al., 1989) correspondant approximativement à 0,25 kg ai/ha, 600 L d'eau/ha 14 jours avant la moisson. Quatre des fruits les plus mûrs ont été choisis 4, 7 et 14 jours après la pulvérisation aussi bien qu'un échantillon après récolte à 21 jours. Dans une expérience supplémentaire, les feuilles de deux plantes ont été pulvérisées avec une solution à 0,15% de la formulation 25 WP contenant le [¹⁴C-méthylène] imidaclopride. Quatorze jours plus tard, les fruits matures ont été récoltés et la radioactivité a été déterminée. Le taux de radioactivité résiduel (TRR) a diminué dans tous les échantillons. Des résidus inférieurs obtenus dans les échantillons post-moisson peuvent être attribués à la dilution de croissance plutôt qu'à la dégradation. La plupart du TRR pourrait être parti au lavage des surfaces par le méthanol. La plupart de la radioactivité retrouvée dans le lavage et les extraits de tomate était constituée par le composé parental inchangé. Les composés 5-hydroxy et dénitro ont été détectés à des quantités significatives, jusqu'à 4,2 et 4,8% du TRR 21 jours après l'application. Trois autres métabolites ont représenté 1-2% du TRR : l'oléfine pour 1,1% (0,007 mg/kg) et le conjugué CHMP gentiobioside pour 1,7% (0,011 mg/kg) à 21 jours, l'urée (2-cétone) pour 1,9% (0,016 mg/kg) à 14 jours. De plus la nitrosamine et CHMP glucoside à 21 jours représente 0,7% (0,004 mg/kg) et 0,3% (0,002 mg/kg). L'expérience de translocation n'a montré aucun transport significatif de la radioactivité des feuilles traitées vers les fruits non traités.

Quatorze jours après la pulvérisation des feuilles, la radioactivité récupérée dans les tomates représente 0,003 et 0,006 mg/kg équivalent composés parentaux, manifestement au-dessous du TRR détecté 14 jours après l'application directe sur les tomates.

Le métabolisme du [¹⁴C-méthylène] imidaclopride a été étudié chez la tomate, la pomme et la pomme de terre après pulvérisation, chez l'aubergine, la pomme de terre et le riz après application de granules au sol, chez le maïs et le coton après traitement des semences, chez le riz après le traitement de plantules et chez le tabac après pulvérisation combinée avec l'application des granules au sol. L'absorption, la translocation et le métabolisme étaient semblables chez toutes les plantes étudiées. Chez l'aubergine, la pomme de terre, le riz et le coton, l'absorption de l'imidaclopride radiomarké du sol après application granulaire ou traitement de graine était faible et s'étendait de 1,8 à 4,9% de la radioactivité appliquée sur les parties aériennes de plantes mûres.

Chez le riz et l'aubergine (cette question n'a pas été examinée chez le coton et la pomme de terre), l'absorption était totale après la première moitié de la période de croissance et n'a pas augmenté sensiblement dans la deuxième moitié. Dans toutes les études, la translocation s'est effectué principalement des racines vers les feuilles. Après application au sol, la plupart de la radioactivité a été trouvée dans le feuillage, avec des quantités mineures dans les fruits et les graines. L'application par vaporisation sur des pommes de terre montre que le transport des feuilles pulvérisées aux tubercules était négligeable. La translocation acropétale a été aussi démontrée par des expériences de translocation chez la pomme et la tomate. Quatorze jours après l'application d'imidaclopride sur les feuilles, la radioactivité dans les fruits était négligeable. La distribution vers d'autres parties de la plante (tiges, feuilles non traitées) n'a pas été examinée.

Dans toutes les études, trois voies de dégradation ont été observées et sont présentes dans presque toutes les parties de la plante :

- L'hydroxylation de l'anneau imidazolidine menant à des composés mono- et dihydroxylés et la perte d'eau ultérieure pour former l'oléfine.
- La réduction du groupe nitré pour former la nitrosamine et la perte de ce groupe avec la formation des métabolites guanidine.
- L'oxydation et le clivage du pont de méthylène pour former le 6-chloro-3-pyridylméthanol et son conjugué avec une deuxième oxydation en acide 6-chloronicotinique (Figure I-9).

Dans le grain de riz après application de granules au sol et dans des tubercules de pommes de terre après application par pulvérisation, la radioactivité totale récupérée était très faible et très peu de métabolites ont pu être détectés. L'analyse des résidus non extraits dans le riz et le grain de maïs a montré la dégradation apparente d'imidaclopride en CO₂ et l'incorporation ultérieure dans des constituants naturels comme l'amidon, la glutéline ou la lignine.

Les quantités de composé parental inchangé dépendaient de la méthode d'application. Après la pulvérisation, la pénétration par la peau dans les fruits ou les feuilles était lente. L'absorption par les racines après application de sol a mené dans la plupart des cas à une dégradation plus intensive et des niveaux inférieurs d'imidaclopride inchangée.

Le sol traité avec l'imidaclopride a une efficacité exceptionnelle en tant qu'insecticide systémique contre le scarabée de la pomme de terre, *Leptionotarsa decemlineata* (Say).

Une distribution inégale des produits chimiques dans les plantes de pommes de terre pourrait aboutir à des concentrations différentielles, qui pourraient expliquer la discrimination entre les génotypes de sensibilité variable (Olson et al., 2004).

Des différences significatives de la mortalité larvaire et de développement ont indiqué que la concentration d'imidaclopride a été inégalement distribuée dans le feuillage des pommes de terre pendant 6 à 14 semaines après la plantation. La concentration d'imidaclopride était la plus faible dans les tissus plus jeunes des feuilles supérieures et la plus élevée dans les feuilles plus âgées. La concentration inférieure dans des feuilles supérieures était toxique pour les larves susceptibles, mais n'a pas tué de façon substantielle les larves tolérantes.

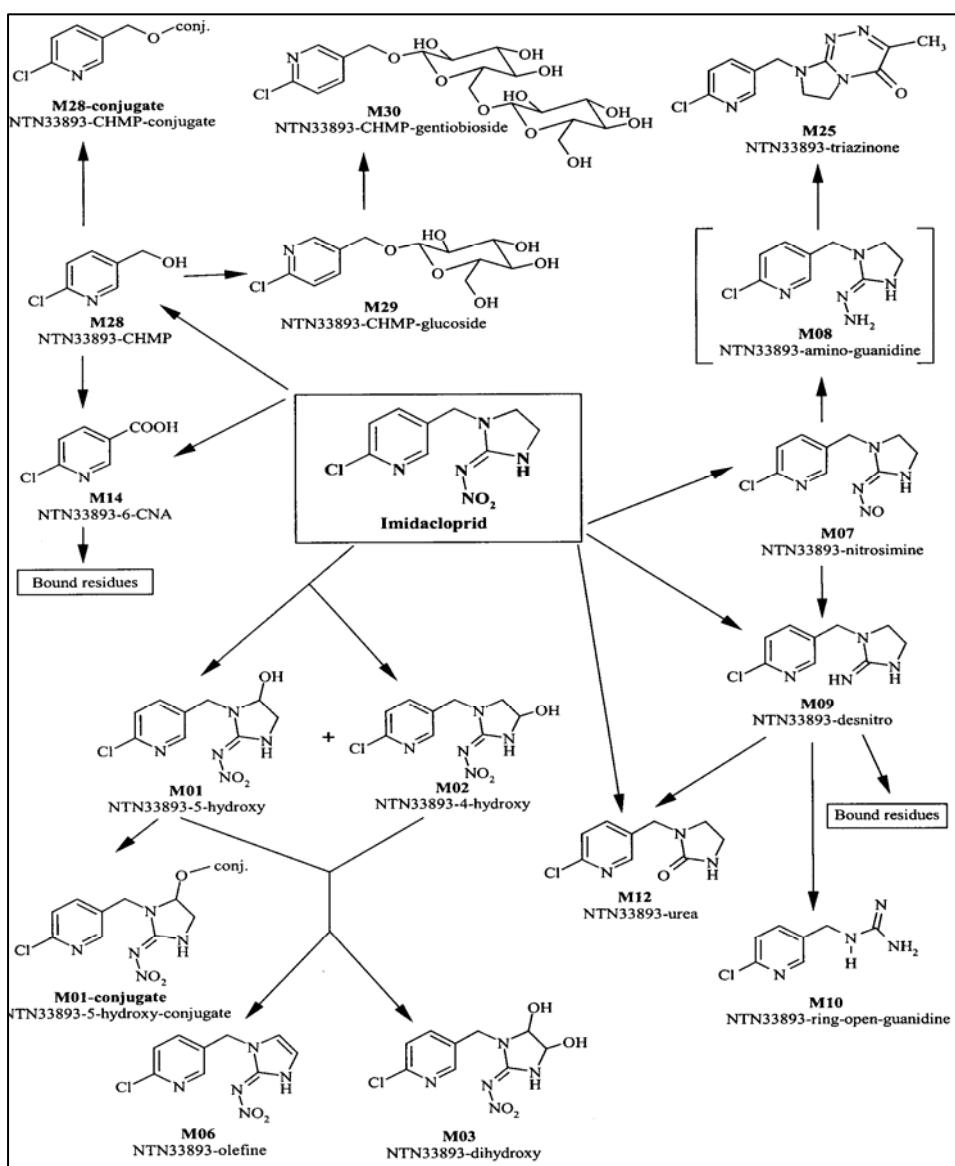


Figure I-9. Voies métaboliques de l'imidaclopride chez les plantes.

Les résultats suggèrent que la concentration plus forte d'imidaclopride dans les feuilles inférieures puisse agir comme une barrière toxique à la colonisation de scarabées susceptibles, mais peut permettre aux individus plus tolérants d'atteindre la partie supérieure. Un scénario possible de comment la concentration différentielle de l'insecticide systémique pourrait influencer le taux de développement de résistance est discuté. L'imidaclopride est transporté principalement dans le xylème et ses propriétés systémiques devraient permettre d'être également distribué aux jeunes plantes en croissance tant mono- que dicotylédones (Nauen et al., 1999).

Une étude par (Westwood et al., 1998) chez la betterave sucrière a montré que la concentration d'imidaclopride était 6 fois plus élevée dans les feuilles les plus basses comparées avec les feuilles supérieures 49 jours après l'application. La concentration dans les feuilles moyennes était environ la moitié de celle trouvée dans les feuilles inférieures. Ce modèle de distribution a été aussi observé avec l'insecticide systémique carbofuran chez le sapin de Douglas (Merlina et al., 1994). En outre, l'imidaclopride n'a pas été redistribué des vieilles aux nouvelles feuilles car la translocation par les tubes du phloème est connue pour être minimale (Nauen et al., 1999).

Ils ont montré que l'oléfine métabolite et deux métabolites hydroxy sont aussi actifs contre la mouche blanche *Bemisia tabaci* chez le coton. Le métabolite 4-hydroxy est aussi actif que l'imidaclopride et l'oléfine plus active. Deux métabolites hydroxy étaient aussi actifs contre des biotypes d'Almeria (Espagne) et une souche de type B de Californie. Les propriétés physico-chimiques des métabolites ont été comparées avec celles de l'imidaclopride. Des valeurs de log Kow plus basses ont été trouvées pour tous les métabolites examinés. De façon intéressante, l'oléfine était le seul composé avec un proton acide ($pK_a = 7,2$) dans des conditions de pH neutre, suggérant qu'il puisse être plus mobile dans le phloème. Pour examiner cette hypothèse, ils ont comparé la translocation de l'oléfine radiomarké après l'application foliaire avec celle de l'imidaclopride radiomarké chez le coton. Aucune différence majeure n'a été trouvée dans la translocation acropétale ou basipétale (Nauen et al., 1999).

5.1.4. Devenir environnemental dans le sol

Deux études de laboratoire sur la dégradation aérobie du [^{14}C méthylène] imidaclopride ont permis d'identifier sept métabolites dans les extraits de sol (Anderson et al., 1990a, b). Les modèles généraux résultant de la dégradation ont été confirmés dans deux nouvelles études (Anderson et Fritz, 1990a, b).

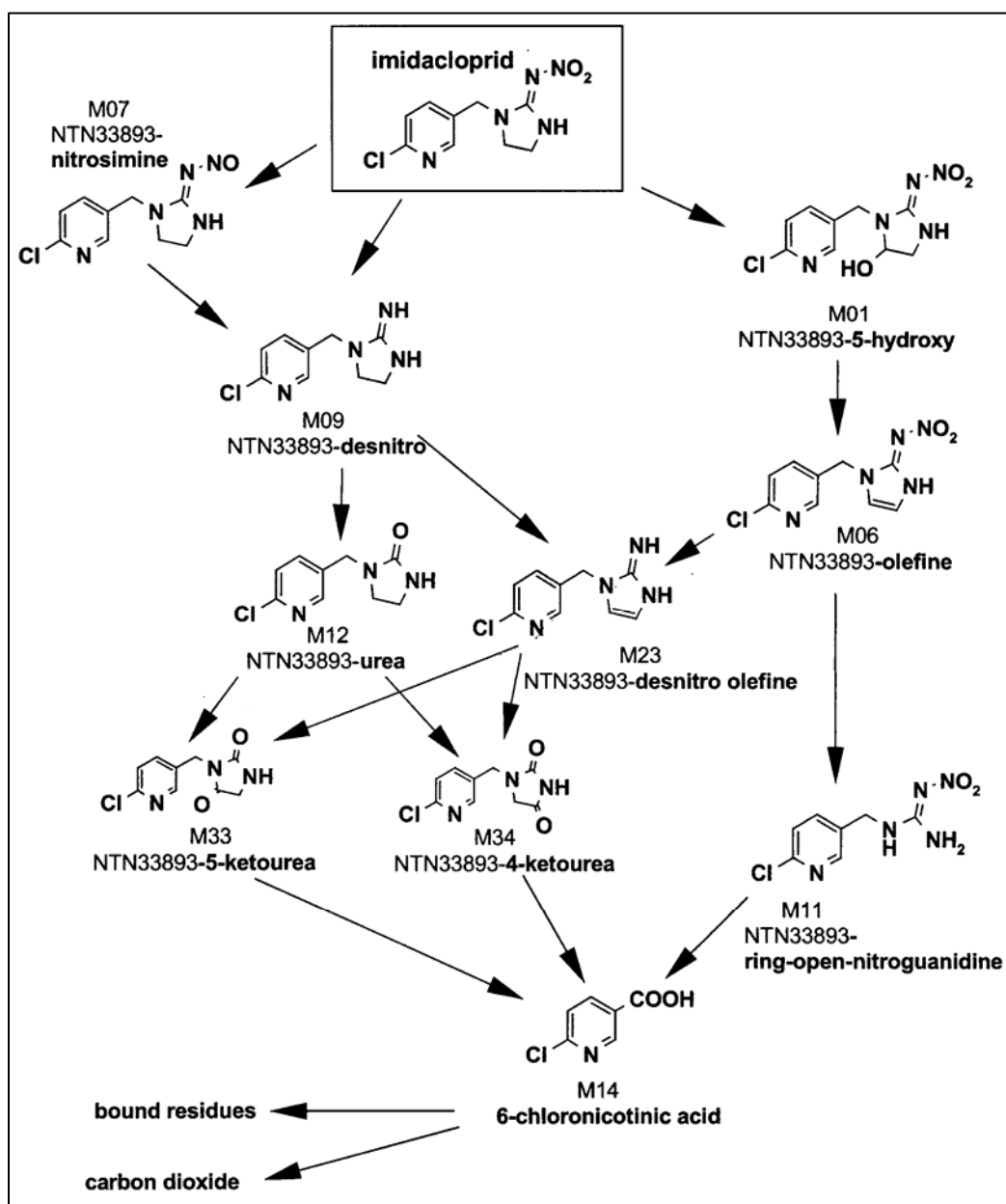


Figure I-10. Voies de dégradation de l'imidaclopride dans le sol (d'après Fahl, U. et Leicht, W., 2001).

Deux nouveaux produits de dégradation ont été découverts suite à un essai permettant de neutraliser la diminution d'activité microbienne observée dans les autres essais (Scholtz, 1992). Aucun des neuf produits n'a expliqué plus de 10% de la radioactivité appliquée, le pourcentage le plus élevé dans un seul composant était 3,3%, ce qui correspond à des concentrations dans le sol inférieures à 0,01 mg/kg. La somme de tous les produits n'a jamais excédé 6%. Le composant principal dans le sol étant toujours le composé parent, une minéralisation pourrait être envisagée, dans le cas où la plupart des intermédiaires seraient dégradés plus rapidement que l'imidaclopride et seraient donc seulement à des concentrations de traces.

Dans les voies proposées dans la Figure I-10, le métabolite dénitro-oléfine est inclus bien qu'il ait seulement été trouvé dans des études de dissipation des champs en Amérique du Nord (Formella et Cink, 1997 ; Philpot et Yen, 1998).

6. La tomate

La tomate (*Lycopersicon esculantum* Miller) est une plante maraîchère qui appartient à la famille des solanacées. Son fruit est une baie rouge, parfois jaune ou orangée, de forme ronde ou plus ou moins allongée, lisse ou creusée de sillons. La pulpe charnue est divisée en loges contenant les graines dans un mucilage. C'est une plante herbacée annuelle tropicale originaire d'Amérique du sud. Elle est peu sensible à la durée de la photopériode (Calvert, 1965 ; Kinet, 1977) et sa gamme de températures optimales de croissance se situe entre 10 et 30 °C (Picken et al., 1986).

Les différentes variétés de tomate sont classées selon deux types : les déterminées et les indéterminées, en fonction du schéma de développement de leur tige principale (Atherton et Harris, 1986). Les variétés de tomate utilisées pour la production en frais sont principalement de type indéterminé (Figure I-11), c'est-à-dire que le développement de leur tige ne se termine pas au moment de l'initiation de la première inflorescence. Le développement de leur tige est au contraire continu dans le temps et consiste en une série de sympodes comportant trois feuilles et une inflorescence terminale et peut atteindre plus de 10 mètres en une seule année de culture sous serre. La plante apparaît donc faussement comme étant une tige principale dotée d'inflorescences latérales internodales. Chez la plante de tomate, l'inflorescence correspond à plusieurs fleurs associées en grappe. Les fruits qui proviennent du développement des ovaires de la fleur sont donc regroupés spatialement en « bouquet ».

D'un point de vue anatomique, les tomates sont des baies composées d'un tissu loculaire comprenant des graines.

La source principale d'eau pour la croissance de fruit de tomate est la sève phloémienne. L'accumulation d'eau représente plus de 90% du poids total de fruit de tomate mûr et seulement 5 à 8% du poids du fruit est dû à la matière sèche (Davies et Hobson, 1981 ; Ho, 1980). Donc, les facteurs affectant l'accumulation d'eau sont déterminants pour la taille du fruit mais aussi pour sa qualité.

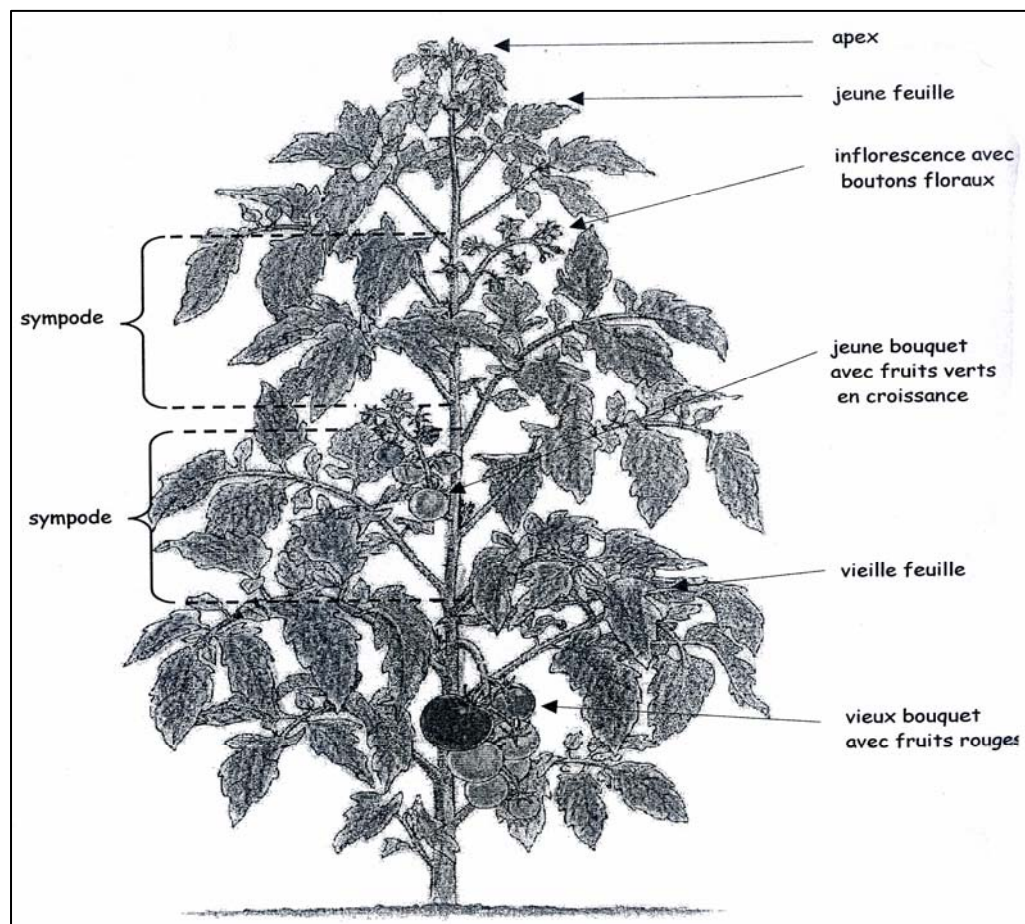


Figure I-11. Dessin d'une plante de tomate (*Lycopersicum esculentum* Miller) indéterminée composée de sympodes (un bouquet et trois feuilles : deux sous le bouquet et une au-dessus du bouquet).

6.1. Les particularités structurales du xylème et du phloème chez la tomate

6.1.1. Le xylème chez la tomate

Chez la tomate, le pédicelle qui relie le fruit au bouquet comprend une zone de renflement nommée zone d'abscission responsable, comme son nom l'indique, de l'abscission du fruit lorsque celui-ci est mûr. Lee (1989) a montré que chez la tomate l'aire de la section correspondant aux vaisseaux xylémiens est réduite dans cette zone d'abscission, alors que celle des vaisseaux phloémiens est fortement augmentée. Cette zone sera donc un lieu de grande résistance aux transferts de sève xylémienne vers le fruit. De plus, Belda et al. (1996) ont montré qu'il y a, depuis la partie proximale du fruit jusqu'à sa partie distale, une réduction : (1) de nombre de vaisseaux xylémiens et (2) de la surface moyenne des sections des vaisseaux du xylème.

Ces réductions de surface totale du xylème et de la densité des vaisseaux du xylème chez la tomate sont d'ailleurs cohérentes avec les observations de Erhet et Ho (1986) qui ont montré que l'importation d'eau et de calcium est plus importante dans la partie proximale du fruit que dans sa partie distale, le calcium pouvant être utilisé comme marqueur du flux xylémien.

6.1.2. Le phloème chez la tomate

Le réseau phloémien de la plante de tomate est particulier puisqu'il comprend un double système de vaisseaux : un phloème dit **interne** ou (péri médullaire) et un phloème dit **externe**. D'après Bonnemain (1965), les mouvements ascendants d'assimilats le long de la tige ont lieu dans le phloème interne alors que les mouvements descendants ont plutôt lieu dans le phloème externe. Au moment de la croissance des fruits, ces derniers peuvent donc importer les assimilats à la fois par le phloème externe et le phloème interne depuis les feuilles situées au-dessus et en-dessous du bouquet. Cependant, l'apport d'assimilats vers le fruit serait majoritairement entretenu par le phloème interne depuis les feuilles sous-jacentes au bouquet. En effet, la surface totale représentée par les éléments conducteurs du phloème interne du pédicelle apparaît plus importante que celle du phloème externe (Bonnemain, 1966).

Dans la tomate, le taux d'importation dans le fruit est inversement proportionnel à la concentration de saccharose du fruit. Puisque le saccharose est le seul sucre importé depuis les feuilles et que les hexoses sont les principaux sucres dans le fruit, le taux d'importation est une fonction de l'hydrolyse du saccharose importée (Walker et Thornley, 1977).

La participation d'invertases dans l'importation d'assimilats a été démontrée dans l'inflorescence pendant le développement des fleurs.

Cependant, il n'a pas été établi si l'hydrolyse a lieu : au point de transfert à travers la membrane des éléments criblés des vaisseaux phloémiens, dans les parois cellulaires, au point d'assimilation dans les cellules puits de fruit, ou même à l'intérieur des vacuoles des cellules de fruit. En termes de régulation de l'activité des invertases, Eschrich (1980) a spéculé qu'un pH bas, dans les parois cellulaires, active les cellules du puits en échange du potassium dans l'espace libre et un pH plus élevé, qui inactive l'invertase peut être obtenu par une augmentation de l'assimilation de calcium plutôt que de potassium. (Ho 1980 ; HO et Baker, 1982).

Comme le saccharose est le principal sucre assimilé dans la tomate (Walker et Ho, 1977 ; Ho et al., 1981), la concentration de matière sèche dans le courant phloémien peut être assimilée à la concentration en saccharose. Cependant le déclin de concentration dans la sève phloémienne pendant le développement du fruit, pourrait être surestimé, pour les valeurs élevées de la transpiration dans l'étape postérieure au développement du fruit (Ho, 1987).

Les méristèmes apicaux de plante sont présents dans les tiges et les racines et à moins que les tissus ne montrent une modification secondaire pour le stockage, l'eau et les glucides ont tendance à passer dans les tissus avec un temps de séjour court. Les fruits ont leur origine dans le méristème apical, aussi bien que les tiges et les feuilles, mais à la différence des tiges et des feuilles, le fruit accumule de la matière. La croissance du fruit dépend d'une série complexe de divisions cellulaires coordonnées et d'expansion (Tukey et Jeune 1939, 1942 ; Nitsch, 1971).

Beaucoup de fruits charnus se développent en trois étapes discrètes : la division cellulaire, suivie par l'élongation cellulaire et la différenciation tissulaire. Les tissus majeurs de stockage grandissent en volume par un agrandissement cellulaire causé par un apport d'eau produisant une augmentation spectaculaire de la taille des cellules dans des tissus de stockage (Tukey et Jeune 1939, 1942) mais il n'y a pas d'augmentation du nombre de cellules.

Pendant l'étape finale d'agrandissement du fruit, seulement les tissus épidermiques montrent une augmentation de nombre de cellules, l'épiderme devrait continuer à s'agrandir pour couvrir l'augmentation du volume du fruit. En termes strictement physiques, la croissance et l'expansion des fruits sont les conséquences de l'accumulation localisée d'eau et de matière sèche.

Le changement volumétrique du fruit n'est donc causé que par l'agrandissement des cellules individuelles qui forment les tissus du fruit et cela ne peut seulement avoir lieu que comme une conséquence de la cellule subissant un afflux d'eau. Cet afflux d'eau doit être causé par des potentiels réduits d'eau dans les cellules, qui sont à leur tour les résultats des potentiels osmotiques réduits qui se développent d'écartements précédemment transportés.

La tomate 'Montfavet 63-5' est l'une des tomates les plus précoces. Ses pieds produisent de gros fruits précoces, très ronds et très fermes. C'est une variété présentant un rendement considéré comme excellent.

CHAPITRE II

ABSORPTION ET TRANSFERT DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE APRES TRAITEMENT DU SOL

II. ABSORPTION ET TRANSFERT DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE APRES TRAITEMENT DU SOL

1. Introduction

Le comportement systémique de l'imidaclopride a été étudié dans plusieurs espèces comme le blé, le coton et la betterave à sucre, particulièrement après le traitement de semences (Stein-Donnecke, 1992 ; Westwood, 1998). Ces études ont démontré que l'imidaclopride est principalement transporté de manière acropétale dans le xylème. L'imidaclopride est un composé polaire, $\log K_{ow} = 0,57$; une telle polarité mène à la conservation basse par des tissus comme des racines et de là au transport rapide par le xylème au niveau des marges et des espaces interveinaux des feuilles (Briggs, 1982 ; Briggs, 1993 ; Stein-Donnecke, 1993).

L'imidaclopride est connu pour s'adsorber sur des particules de sol, ce qui a pour résultat une réduction de la fraction soluble de l'imidaclopride dans l'eau de sol (Oi, 1999 ; Capri, 2001). De plus, l'imidaclopride est dégradé dans le sol en plusieurs composés, réduisant sa biodisponibilité (Krohn, 2002). Par conséquent, une gamme étendue de valeurs de la demi-vie de l'imidaclopride dans le sol a été trouvée, de 40 à 288 jours (Rouchaud, 1996 ; Scholtz, 1992).

Dans ce chapitre, différentes expériences ont été réalisées pour déterminer le devenir de l'imidaclopride et de ses résidus dans le pied de tomate après absorption de l'imidaclopride à partir du sol par la plante. Le but était dans un premier temps d'avoir un couple modèle plante/pesticide bien établi et dont les paramètres de rentrée du pesticide étaient correctement identifiés. Pour cela, après avoir déterminé le devenir dans un système standard, nous avons déterminé d'une part la biodisponibilité pour la plante de la molécule présente dans le sol au cours du temps. Ensuite, afin de chercher le modèle le plus performant pour la suite de nos investigations, nous avons étudié le devenir de l'imidaclopride dans deux systèmes de culture, l'un où la croissance de la plante est limitée par l'excision du bourgeon terminal de la plante, l'autre par la limitation de la durée de la contamination en changeant le sol en cours de culture.

2. Traitement du sol

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Produits chimiques et standards de synthèse

L'imidaclopride, de qualité Pestanal (99,7% de pureté), utilisé pour le traitement du sol a été obtenu auprès de Cluzeau (Bordeaux, France). Le [U-¹⁴C-imidazolidine] imidaclopride (activité spécifique = 26,8 mCi mmol⁻¹, pureté radiochimique = 99,9 % déterminée par radiochromatographie liquide haute performante en phase inverse (radio RP-CLHP) provient de l'Institut of Isotopes (Budapest, Hongrie). Les métabolites de l'imidaclopride ont été fournis par Bayer (Monheim, Allemagne). Les solvants utilisés pour les extractions et les analyses en CLHP ont été obtenus de Scharlau Chemie (Barcelone, Espagne).

2.1.2. Détermination de la radioactivité

Les différentes parties des plantes ont été lyophilisées pendant 72 h pour enlever l'eau puis pesées. Ensuite, chaque échantillon a été congelé à - 80 °C et broyé à l'aide d'un broyeur à bille (Bioblock, Illkirch, France) pendant 5 min. La radioactivité totale a été mesurée pour les différentes parties de plante après combustion oxydative d'aliqotes à l'aide d'un oxidizer (modèle 307, Packard, Downers Grove, IL). Le dioxyde de carbone marqué résultant a été piégé dans un mélange de solvants de scintillation (Carbosorb/Permafluor, 7:10, v/v ; Perkin Elmer LAS, Courtaboeuf, France) et la radioactivité a été mesurée par scintillation liquide à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard Tricarb 2200CA).

2.1.3. Autoradiographie

Des plantules de tomate âgées de 15 jours ont été déterrées et leurs racines bien lavées à l'eau pour les débarrasser de la terre. Elles sont ensuite plongées dans 50 ml d'une solution contenant 0,5 mg d'imidaclopride non marqué et 10 µCi d'imidaclopride radiomarké. Après trois jours, les racines sont rincées à l'eau et essuyées avec un papier absorbant. Ensuite, la plantule est placée dans une cassette de Phosphor-Imager.

Après un mois d'exposition, les images sont développées à l'aide du Phosphor-Imager (modèle 445SI, la Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) pour visualiser la distribution de la radioactivité dans la plante.

2.1.4. Absorption et transfert à différentes doses

Des plantules de tomates âgées de 15 jours après la levée ont été transplantées dans un sol composé de terre et de sable (50:50, p/p, 1,5 kg par pot) contenant de l'imidaclopride. Chaque pot contenait de 5 à 500 µg d'imidaclopride et 3 µCi d'imidaclopride radiomarqué. Pour chaque concentration, trois répétitions ont été effectuées. Les plantules ont été placées dans un phytotron et arrosées chaque jour avec une solution nutritive. Après 30 jours, les plantes ont été récoltées en séparant les feuilles des racines puis congelées à - 80 °C, lyophilisées et broyées. Une aliquote de chaque broyat a été brûlée pour quantifier les résidus dans les parties aériennes et les parties racinaires.

2.1.5. Protocole d'essais

L'objectif était de déterminer le transfert et la distribution de l'imidaclopride au cours du temps.

Les graines de tomate (*Lycopersicum esculantum* L. cv. montfavet 63-sf) de la famille des solanacées ont été obtenues de l'INRA (France). Les graines ont été semées individuellement dans des pots de 150 ml en plastique contenant un mélange de terre et de sable (1:1, p/p). Les plantules ont été cultivées pendant deux semaines dans une armoire climatisée réglée à 25 °C le jour et 19 °C la nuit avec une photopériode de 16 h et 350 µEinstein m⁻² s⁻¹ PAR. Les plantules de tomate ont été transplantées dans des pots de 1 L, chacun contenant un mélange homogène de terre et de sable (1:1, p/p), 1 mg d'imidaclopride et 4 µCi d'imidaclopride radiomarqué. Les plantes ont été cultivées dans les conditions extérieures sous abri entre juin et septembre et les bourgeons latéraux ont été supprimés dès leur apparition (Figures II-a., b., c., d.). Après 30 jours, les plantes ont été divisées en trois séries :

- *la série standard* : les plantes ont poussé dans le sol contaminé sans intervention ;
- *la série changement du sol* : la source de contamination a été supprimée. Les plantes ont été retirées du sol contaminé par l'imidaclopride radiomarqué. Les racines ont alors été bien rincées à l'eau courante environ dix minutes puis les plantes ont été replantées dans un sol non contaminé par l'imidaclopride ;
- *la série excision de l'apex* : l'apex des plants de tomate a été excisé pour éviter la formation de nouvelles feuilles, afin d'empêcher la dilution de la molécule au cours de la croissance.

Tous les 15 jours, quatre plantes de chaque série ont été récoltées pour quantifier la radioactivité dans les différentes parties de la plante.



Figure II-a. Plantules de tomate prêtes à être transplantées.



Figure II-b. Plantes de tomate avant la floraison.



Figure II-c. Inflorescence d'une plante de tomate.



Figure II-d. Fruits d'une plante de tomate variant par le degré de maturité.

2.2. Résultats

2.2.1 Autoradiographie

L'autoradiographie des plantules dont les racines ont été exposées à la solution d'imidaclopride radioactive (correspondant à un traitement du sol) montre une distribution de la radioactivité dans l'ensemble de la plante (Figure II-1).



Figure II-1. Autoradiographie d'un plant de tomate 3 jours après absorption racinaire d'une solution de [^{14}C] imidaclopride.

2.2.2 Absorption en fonction de la dose

Après contamination du sol par des concentrations croissantes d'imidaclopride, la quantité absorbée par les plantes durant les 15 jours de culture augmente proportionnellement à la dose dans le sol (Figure II-2.a). Le taux d'absorption représente $3,3 \pm 0,2\%$ de cette dose. Les concentrations obtenues sont elles aussi proportionnelles à la dose (Figure II-2.b). La majorité des résidus s'est retrouvée dans les parties aériennes. A la dose la plus faible, la concentration moyenne des résidus est de $0,015 \pm 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$ et à la plus forte dose de $1,98 \pm 0,076 \mu\text{g g}^{-1}$ dans les feuilles. Dans les racines, les concentrations sont environ trois fois plus faibles, de $0,0051 \pm 0,0008 \mu\text{g g}^{-1}$ à $0,57 \pm 0,086 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivement pour les doses 5 et 500 μg .

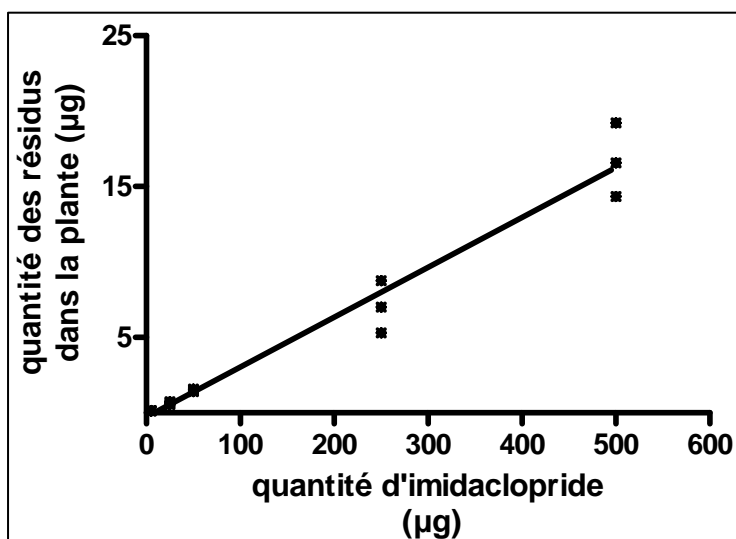


Figure II-2.a. Quantité des résidus d'imidaclopride dans la plante de tomate en fonction de la quantité d'imidaclopride dans le sol (µg par pot ; 1,5 kg de sol par pot) n=3.

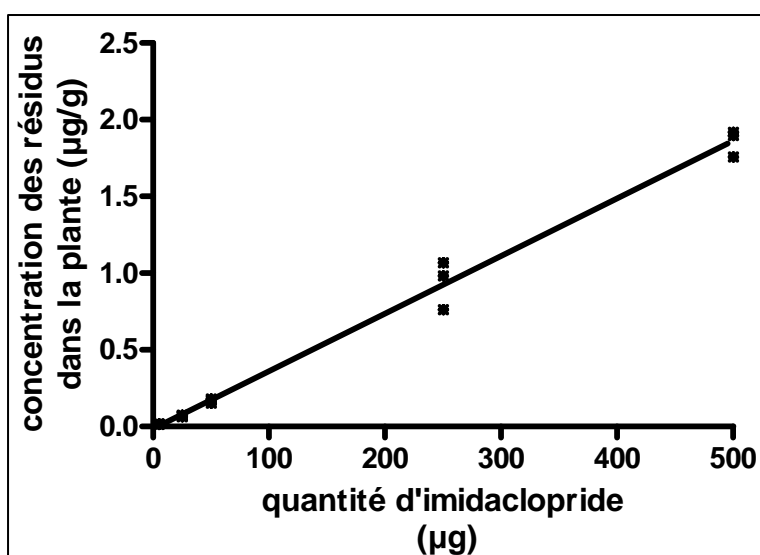


Figure II-2.b. Concentration des résidus d'imidaclopride dans les plantes de tomate en fonction de la quantité d'imidaclopride dans le sol (µg par pot ; 1,5 kg de sol) n=3.

2.2.3. Cinétique de translocation

2.2.3.1. Série standard

Trente jours après la transplantation des plantules de tomate dans le sol contaminé par l'imidaclopride radiomarké, les plantes ont absorbé 2,3% de la dose appliquée dans le sol. La radioactivité est retrouvée dans toutes les parties de la plante mais dans des proportions différentes : 3,5% ont été retrouvés dans les racines, 96,3% dans les feuilles et 0,3% dans les fleurs (Tableau II-1).

Jours	Absorption (%)	Feuilles	Fruits	Racines
30	2,3	96,29	0,26	3,45
45	5,08	85,20	0,70	14,10
60	7,9	87,65	2,10	10,24
75	7,05	86,90	4,70	8,40

Tableau II-1. Quantité et distribution des résidus d'imidaclopride absorbés par les plantes à différents temps pour la série standard n= 4 pour chaque temps.

Quinze jours plus tard, i. e. 45 jours après la transplantation, la quantité totale absorbée par la plante a doublé et elle représente 5,1% de la dose appliquée dans le sol. La majorité de la radioactivité, 85,2%, est aussi retrouvée dans les feuilles, 14% ont été retrouvés dans les racines et 0,7% dans les fruits.

Soixante jours après le traitement du sol, la quantité totale absorbée par les plantes était trois fois plus grande que celle absorbée à 30 jours et représente 7,9% de la dose appliquée. La répartition de la radioactivité est la suivante : 87,6% dans les feuilles, 10,2% dans les racines et 2,1% dans les fruits.

Par contre, 75 jours après le traitement du sol, nous avons relevé une diminution de la quantité totale de radioactivité dans la plante de 10,7% par rapport à la quantité absorbée à 60 jours.

A tous les temps, la grande majorité de la radioactivité est donc retrouvée dans le feuillage. La Figure II-3 montre l'évolution, au cours du temps, des quantités de résidus ou métabolites dans chaque feuille en fonction de leur masse. Cette figure met en perspective, en même temps, la croissance des feuilles et le flux de radioactivité dans celles-ci. Pour un temps donné, on peut remarquer que les feuilles se répartissent sur le graphe de manière ordonnée en fonction de leur position sur la plante, la feuille la plus basse étant le numéro 1.

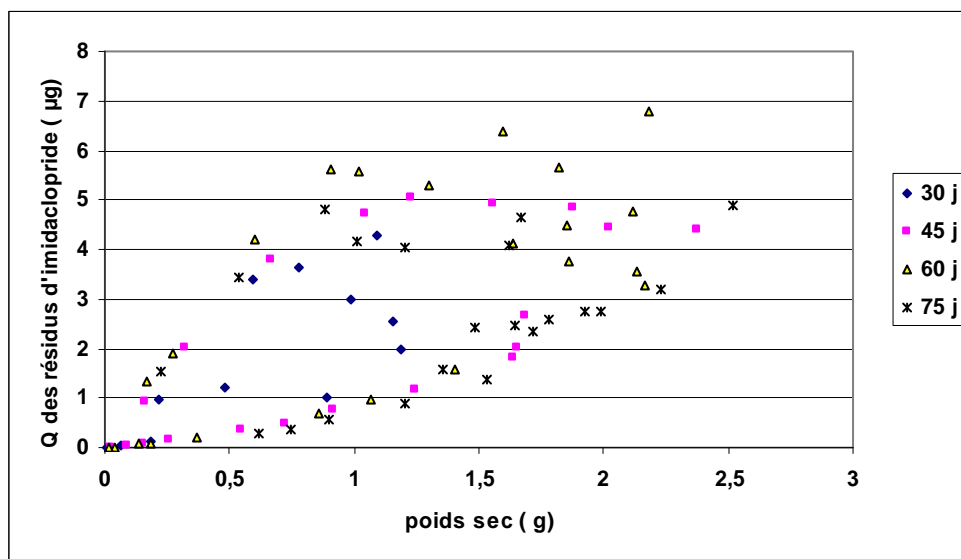


Figure II-3. Relation entre le poids sec et la quantité de résidus d'imidaclopride dans les feuilles de tomate de la série standard.

Cette répartition peut être matérialisée par une courbe en forme de spirale dont les paramètres s'accroissent au cours du temps, jusqu'à 60 jours. Au-delà, pour le stade de récolte 75 jours, un tassement de la courbe semble s'observer. Ainsi, jusqu'à 60 jours, croissance et augmentation de la quantité de radioactivité vont de pair. Par contre, au-delà (stade 75 jours), on peut distinguer trois lots de feuilles dont l'évolution diffère et qui dépend de leur position sur l'axe de croissance de la plante. Un premier lot est constitué par les feuilles du bas de la plante, les plus âgées, un deuxième lot de feuilles intermédiaires et le troisième rassemblant les plus jeunes feuilles. Dans le premier, la croissance des feuilles (feuilles 1 à 5) est terminée entre 60 et 75 jours et la quantité de radioactivité est en diminution.

Dans le troisième lot, les feuilles (feuilles > à 14) continuent à croître et les quantités de radioactivité entre 60 et 75 continuent à augmenter. Dans le deuxième lot, les feuilles (feuilles 6 à 14) d'âge moyen, on observe deux phénomènes, d'une part une diminution quasi-générale de la masse de ces feuilles mais aussi une diminution relativement importante de la quantité de radioactivité.

Lorsque l'on convertit la relation entre la quantité de résidus dans les feuilles et la masse de ces dernières en termes de concentrations, on observe dans les plantes un gradient décroissant de concentrations des résidus d'imidaclopride des feuilles basses vers les feuilles sommitales (Figure II-4). Les premières feuilles, les plus âgées, sont celles dont la durée d'exposition à la solution du sol est aussi la plus longue.

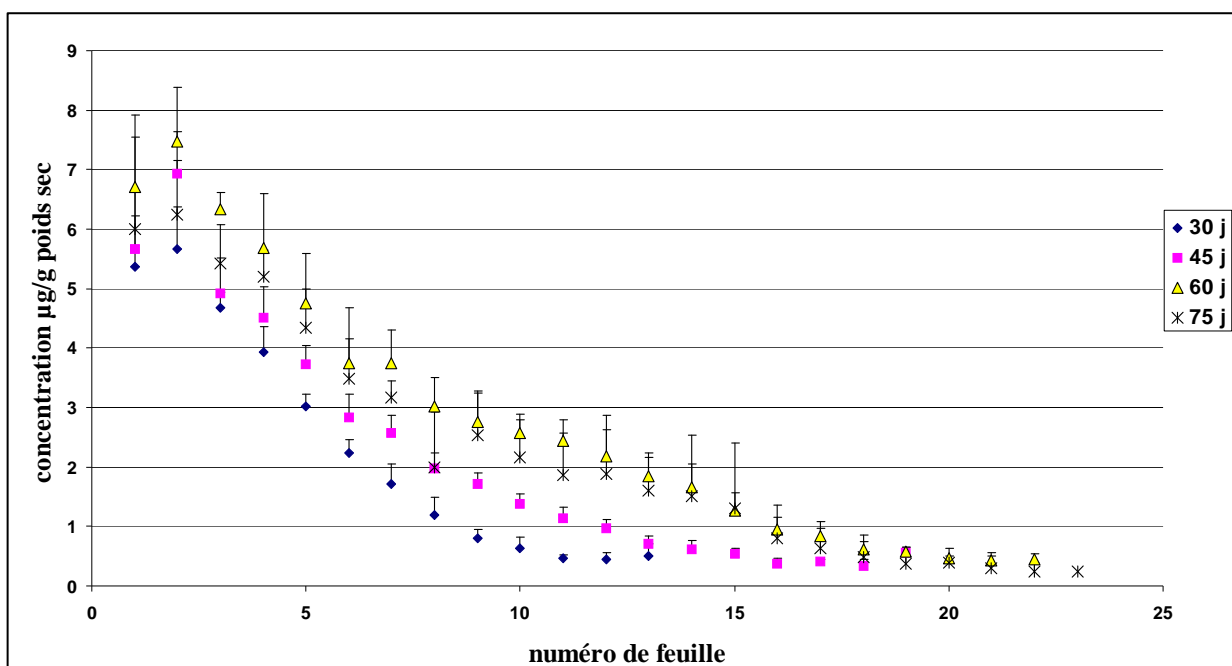


Figure II-4. Concentration des résidus d'imidaclopride dans les feuilles de plantes de tomate de la série standard, n = 1 = feuille la plus basse.

Par conséquent, elles ont absorbé le plus de radioactivité en fonction de leur masse. A 30 jours, les concentrations sont de $3,02 \pm 0,26 \mu\text{g g}^{-1}$ dans les feuilles les plus basses (1-9), $0,63 \pm 0,10 \mu\text{g g}^{-1}$ dans les feuilles situées au milieu de la plante (10-12) et seulement de $0,45 \pm 0,17 \mu\text{g g}^{-1}$ dans les feuilles les plus hautes et les plus jeunes. Aux trois autres stades, le même gradient acropétale est observé, mais les concentrations à 45 et 60 jours augmentent entre chaque stade.

Par contre, une diminution des concentrations dans les feuilles entre 60 et 75 jours a également été observée conformément à la diminution de la quantité totale retrouvée dans la plante à ce stade. Cependant, la diminution des concentrations recouvre des phénomènes différents selon les feuilles comme cela a été montré plus haut (Figure II-3). Pour les feuilles les plus basses, la diminution de 13% est due à une perte de résidus radioactifs.

Pour les plus jeunes feuilles, la diminution des concentrations semble due à un accroissement de la masse des feuilles plus rapide que l'augmentation de la quantité de résidus accumulés. Le phénomène est ainsi plus accentué pour les feuilles de l'apex (feuilles > 16), pratiquement non différenciées au stade précédent, pour lesquelles la diminution est de 23,8% alors qu'elle n'est que de 10% pour celles déjà en cours de développement précédemment (feuilles 13-15). Par contre dans les feuilles intermédiaires, la diminution de 16,5% est la conséquence d'une part de la diminution de la quantité de radioactivité mais aussi de la masse des feuilles, diminution tant pour la masse fraîche que pour la masse sèche.

Dans les fruits, la quantité de résidus est directement proportionnelle à la masse des fruits dans les trois bouquets étudiés (Figure II-5). La concentration en résidus dans ces fruits est ainsi en moyenne de $62,9 \pm 2,41 \text{ ng g}^{-1}$. Celle-ci est inférieure aux concentrations retrouvées dans les feuilles les plus proches des bouquets. Dans les fruits, la concentration est indépendante de la position du bouquet sur la plante et de la position du fruit sur le bouquet. De plus, dans ces expérimentations les fruits sont récoltés à différents stades de maturité, des fruits juste formés (fruits verts et de masse faible) à des fruits rouge prêts à être récoltés. Ainsi, le degré de maturité n'influence pas non plus la concentration en résidus dans les fruits. Contrairement aux feuilles, le flux de résidus dans les fruits apparaît constant au cours du temps.

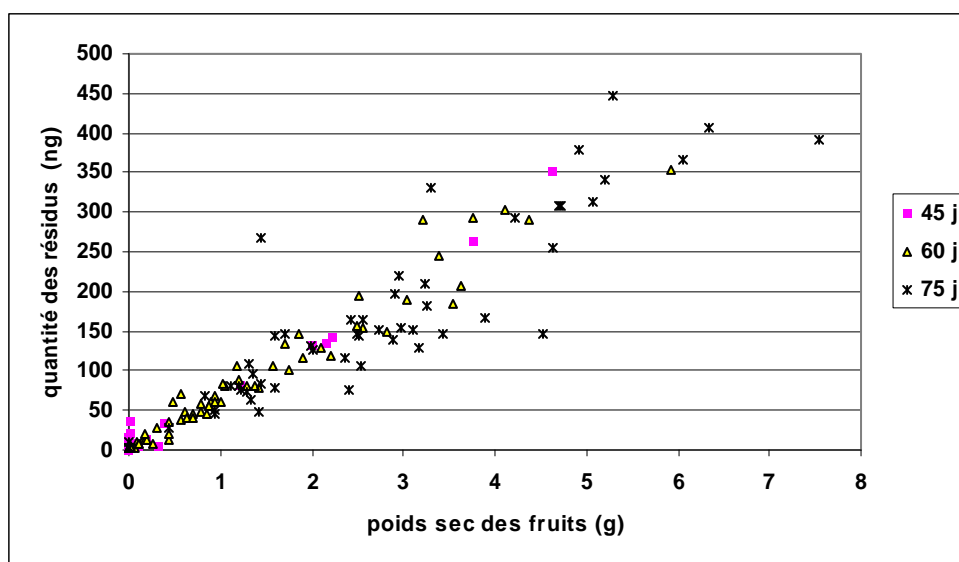


Figure II-5. Relation entre le poids sec et la quantité de résidus d'imidaclopride dans les fruits de tomate de la série standard.

2.2.3.2. Série excision de l'apex

L'absorption et la distribution de l'imidaclopride dans les plantes de tomate ont ensuite été étudiées pendant 45 jours à la suite de l'excision de l'apex après la feuille 12, au niveau de l'insertion du 2^{ème} bouquet floral.

Les quantités totales absorbées ne sont pas significativement différentes du lot standard (Tableau II-2).

Jours	Absorption (%)	Feuilles	Fruits	Racines
30	2,30	96,29	0,26	3,45
45	5,67	81,01	0,33	18,67
60	6,80	89,80	2,90	7,30
75	7,25	83,95	5,44	10,61

Tableau II-2. Quantité et distribution de résidus d'imidaclopride dans les plantes de tomate pour la série excision de l'apex n= 4 pour chaque temps.

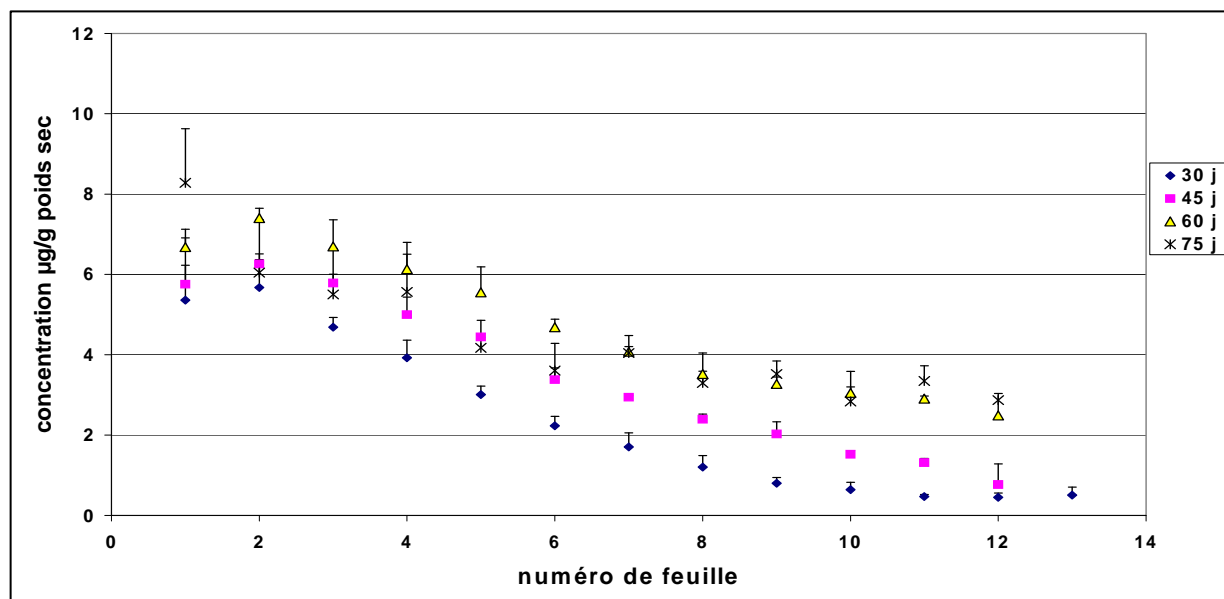


Figure II-6. Concentration des résidus d'imidaclopride dans les feuilles de tomate de la série excision de l'apex.

Un gradient décroissant des concentrations des résidus est observé comme précédemment pour la série standard (Figure II-6). Jusqu'à 60 jours, la concentration dans toutes les feuilles est en augmentation. A 75 jours, les concentrations dans les feuilles les plus basses (feuilles 2 à 6) sont environ 20% plus faibles qu'à 60 jours, diminution qui est du même ordre de grandeur que la diminution observée à 75 jours dans le lot de plantes standard.

Les concentrations retrouvées dans les feuilles après excision de l'apex n'apparaissent pas différentes de celles de la série standard.

Les quantités de résidus d'imidaclopride dans les fruits sont, comme précédemment, moins importantes que celles retrouvées dans les feuilles. Une relation linéaire entre la masse sèche des fruits et la quantité totale de résidus a également pu être établie (Figure II-7). La concentration en résidus dans les fruits est en moyenne de $100 \pm 1,8 \text{ ng g}^{-1}$. Contrairement au feuillage, cette valeur est supérieure à celle des fruits standards d'environ 40%.

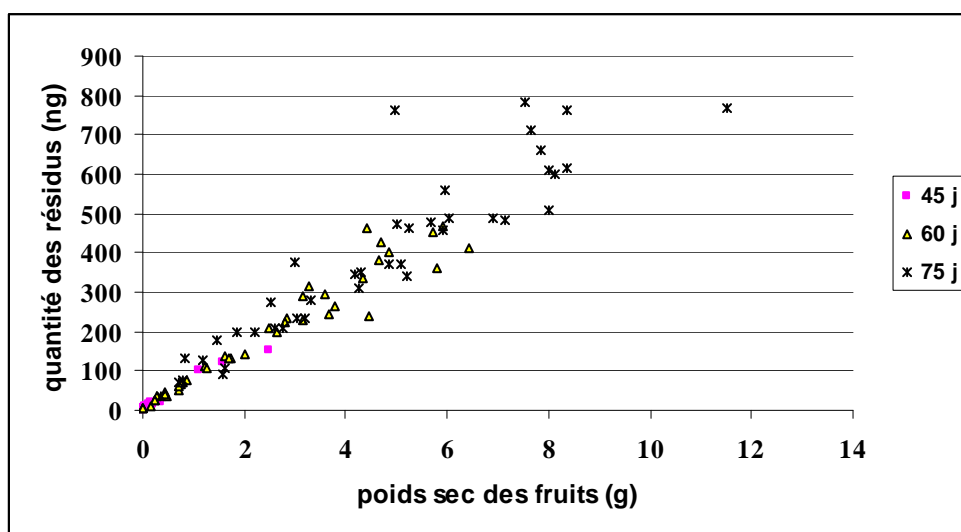


Figure II-7. Relation entre le poids sec et la quantité de résidus d'imidaclopride dans les fruits de tomate de la série excision de l'apex.

2.2.3.3. Série changement du sol

Le transfert des résidus d'imidaclopride dans les plantes de tomate a été étudié pendant 45 jours après élimination de la source de contamination. Le but de cette expérimentation était de déterminer si un transfert de résidus d'un site d'accumulation foliaire peut s'effectuer à l'intérieur de la plante vers une autre partie de la plante.

Quinze jours après le remplacement du sol contaminé par un substrat sans imidaclopride, soit au stade 45 jours (après la transplantation dans le sol contaminé), la quantité totale de radioactivité absorbée continue à augmenter, avec un taux d'absorption de 2,77% (Tableau II-3). Ensuite, le taux d'absorption reste stable, avec respectivement à 60 et 75 jours, un taux de 2,57 et 2,11%.

Cela montre qu'une certaine quantité de radioactivité reste encore disponible au niveau du système racinaire au moins durant les 15 premiers jours suivant le changement de sol. Cette radioactivité pourrait être adsorbée dans la gaine de rhizosphère car les racines ont subi un lavage à l'eau drastique avant la transplantation.

Jours	Absorption (%)	Feuilles	Fruits	Racines
30	2,30	96,29	0,26	3,45
45	2,77	87,25	0,41	12,34
60	2,57	82,22	0,62	17,14
75	2,11	91,20	2,50	6,40

Tableau II-3. Quantité et distribution des résidus d'imidaclopride absorbés par les plantes à différents temps pour la série changement du sol n= 4 pour chaque temps.

L'absorption supplémentaire après changement de sol est toutefois nettement plus faible que pour la série standard. L'augmentation à 45 jours n'est que de 49,6%, comparée aux 120% d'augmentation à 45 jours dans le sol contaminé en permanence de la série standard (cf. 2.2.3.1).

A 45 jours, la distribution de la radioactivité est identique à celle obtenue à 30 jours (Figure II-8). Ainsi les concentrations moyennes en résidus d'imidaclopride dans les feuilles situées en bas de la plante (feuilles 2 à 9) sont de $2,74 \pm 0,26 \mu\text{g g}^{-1}$. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes de celles obtenues pour les mêmes feuilles ($3,02 \mu\text{g g}^{-1}$) au stade 30 jours, stade auquel le sol a été remplacé.

Entre ces deux temps, une augmentation de croissance de ces feuilles de 9,5% a été observée, qui compense l'augmentation de l'absorption. A l'inverse, il y a une diminution de 44% de la concentration en résidus dans les feuilles 10-13 situées au milieu de la plante. Ce résultat peut s'expliquer par une dilution de la radioactivité en raison de la croissance des feuilles qui a augmenté durant la période 30-45 jours de 90%. Ici l'augmentation n'est pas compensée par l'absorption qui a été réduite par le changement de sol. Au-delà de la feuille 13, les feuilles sont des feuilles nouvelles, pas encore développées au stade précédent. Cependant, elles ont aussi absorbé de la radioactivité.

Soixante jours après la transplantation, la stabilisation de l'absorption se traduit par une diminution de la concentration dans les feuilles en raison de la croissance de celles-ci. Dans les feuilles qui se sont développées après 30 jours, de la radioactivité est détectée mais les concentrations sont relativement faibles.

Cependant, même les feuilles se développant tardivement après 60 jours, les feuilles 21 notamment, sont contaminées. A la vue des faibles concentrations retrouvées dans ces nouvelles feuilles et du reliquat d'absorption qui existe encore au moins à 45 jours, il est difficile dans cette expérimentation de déterminer l'origine de la contamination de ces feuilles.

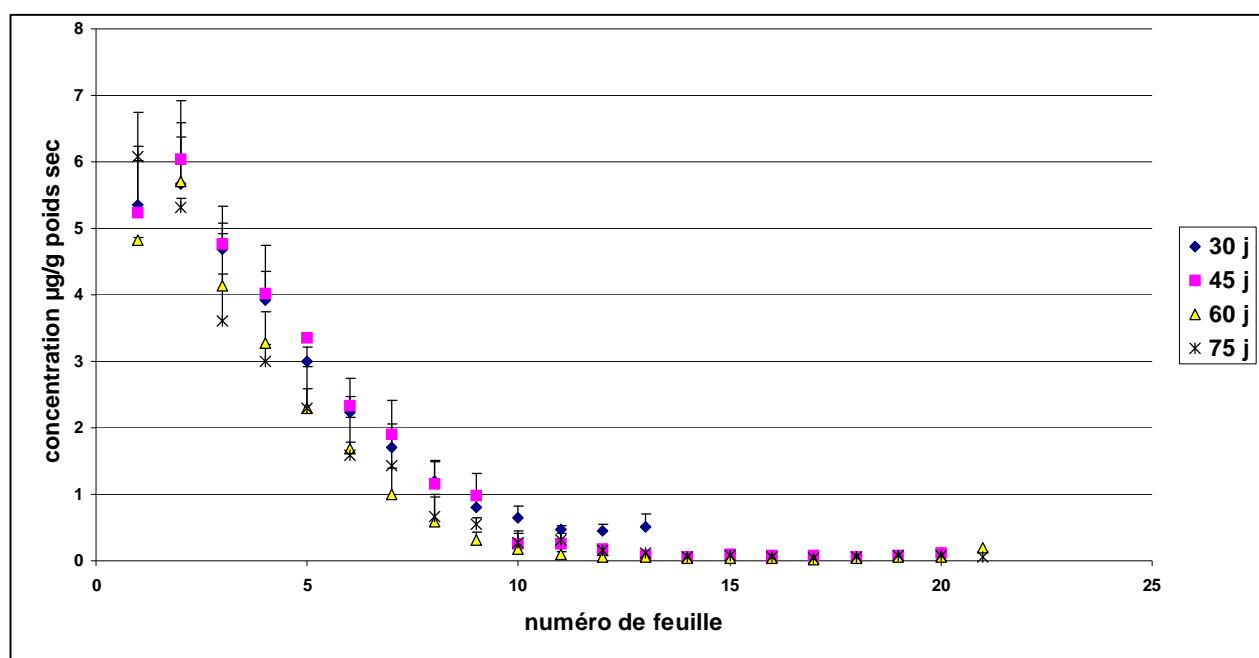


Figure II-8. Concentration des résidus d'imidaclopride dans les feuilles de tomate de la série changement de sol.

Dans les fruits, les quantités de résidus varient fortement en fonction du stade de récolte des plantes (Figure II-9). Contrairement aux autres expérimentations, il n'a pas été possible d'établir une relation claire entre la masse des fruits et la quantité absorbée. Ainsi aux temps 45 et 75 jours, une même relation semble pouvoir être calculée. Par contre à 60 jours, l'absorption est plus faible qu'au stade précédent.

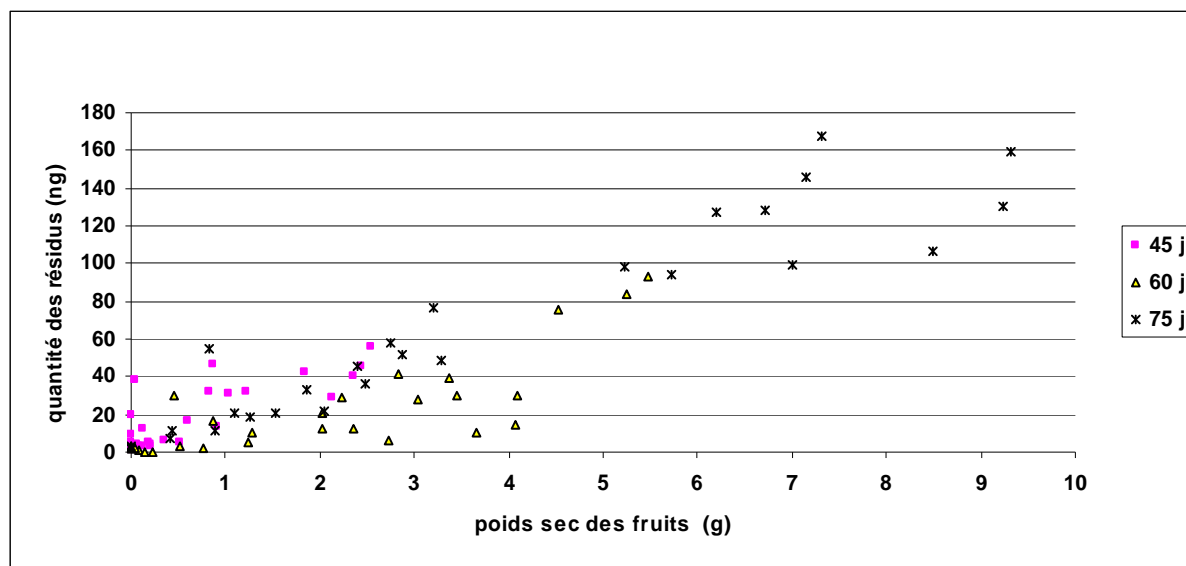


Figure II-9. Relation entre le poids sec et la quantité des résidus d'imidaclopride dans les fruits de tomate de la série changement de sol.

2.2.4. Biodisponibilité de l'imidaclopride

L'imidaclopride est rapidement adsorbé sur les particules du sol (Rouchaud et al., 1996). De ce fait ce produit, malgré un K_{ow} défavorable ($\log K_{ow} = 0,57$), n'est que très peu lessivée par l'eau du sol. Ce faible transfert par la phase aqueuse du sol pourrait aussi se traduire par une diminution de la disponibilité pour la plante. L'objectif était de mesurer l'absorption de l'imidaclopride par des plantes de tomates de même âge mais se développant sur des sols contaminés à des temps différents.

2.2.4.1. Méthode

Un mélange de sol moitié sable et moitié terre a été contaminé par l'imidaclopride (2,6 μCi et 1000 μg d'imidaclopride froid par plante). Après homogénéisation, le mélange a été divisé en cinq lots conservés à -20 °C.

Tous les 15 jours, un lot a été sorti du congélateur et mis dans trois pots placés dans des conditions naturelles. Le sol a été humidifié chaque jour et, à la décongélation du dernier lot, des plantules de tomate âgées de 15 jours ont été transplantées dans ces sols. Après 15 jours de culture, les plantes ont été récoltées en séparant les racines des parties aériennes puis la radioactivité absorbée a été quantifiée dans chaque compartiment.

2.2.4.2. Résultats

Nous avons observé une diminution de la quantité absorbée par les plantes en corrélation avec une augmentation de la durée du vieillissement de la molécule dans le sol. Les plantes transplantées dans un sol contenant l'imidaclopride sans temps de vieillissement (temps 0) ont absorbé le plus fortement la solution, 0,29% de la dose appliquée dans le sol (Figure II-10). Les plantes qui ont été transplantées dans un sol contenant l'imidaclopride depuis 60 jours, en conditions de cultures, ont absorbé moins de solution, 0,13% de la dose appliquée dans le sol.

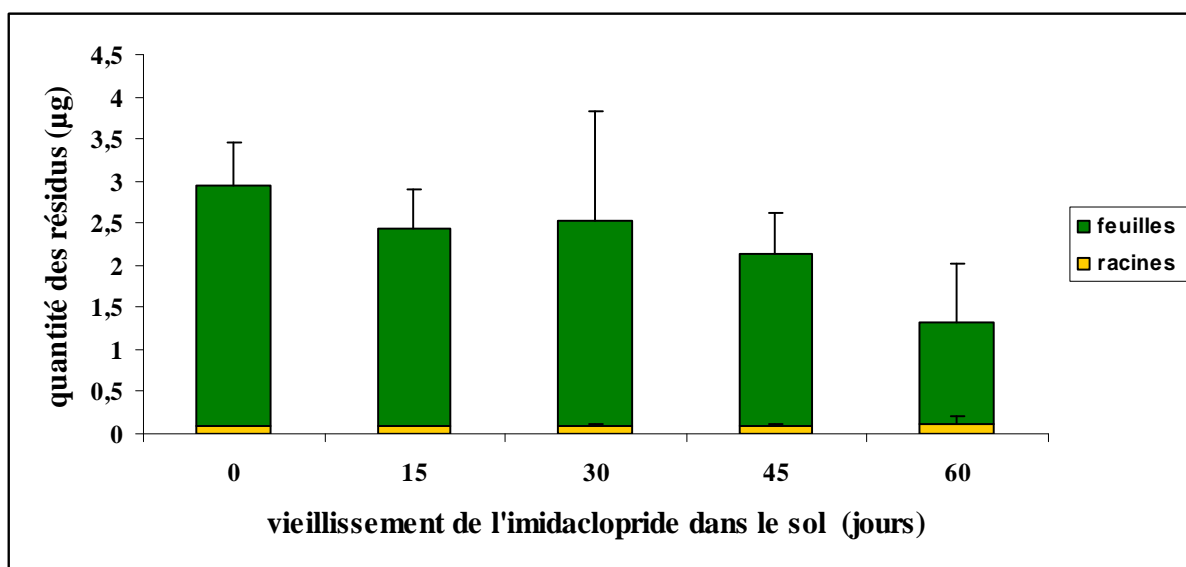


Figure II-10. Quantité des résidus d'imidaclopride dans les feuilles et les racines de tomate après différents temps de vieillissement de l'imidaclopride dans le sol.

3. Transpiration

Le flux xylémien qui permet le transport de l'imidaclopride dans la plante, comme cela a été montré dans ce travail et par d'autres auteurs est mû par la force d'aspiration générée par la transpiration foliaire. Celle-ci est dépendante de plusieurs facteurs qui sont pour les principaux d'une part l'espèce végétale : la feuille (nature de la cuticule, pilosité, nombre de stomates, âge de la feuille, etc.) et d'autre part les conditions climatiques (température, humidité, etc.).

Dans ce contexte, l'objectif était d'étudier pour la plante l'évolution de la transpiration en fonction du stade de croissance de celle-ci, période végétative ou reproductive, de la position des feuilles sur l'axe de la plante et de déterminer l'importance de la transpiration dans la contamination des feuilles et des fruits par les résidus d'imidaclopride.

3.1. Méthodes

Des plantes d'âge variable (15, 30, 45, 60, 75 jours), ayant poussé en conditions contrôlées, ont été retirées du sol et leurs racines bien lavées pour les débarrasser de la terre. Ensuite, ces dernières ont été plongées durant trois jours dans une solution nutritive (solution de Hoagland dilué au 1/2) contenant 2,5 mg d'imidaclopride (71,5 μ Ci) par litre, la surface de chaque b cher a été ferm e en utilisant du papier d'aluminium pour éviter l'évaporation de la solution nutritive. L'expérimentation a été r p t e sur trois plantes. Des sachets contenant du chlorure de calcium anhydre sont placés autour de trois feuilles situ es   différentes hauteurs de la plante, feuilles numéro 6, 12 et 17.

Chaque jour, la quantité d'eau absorb e par la plante et la radioactivité résiduelle dans le bac ont été mesur es et compl t es par une solution fraîche pour maintenir le niveau et la concentration à la valeur de départ. La quantité d'eau transpirée par ces feuilles a été d termin e en pesant chaque jour les sachets. Au bout de trois jours, les plantes ont été r colt es et la radioactivité a été d termin e dans chaque feuille exp riment e et dans le reste de la plante.

3.2. Résultats

La Figure II-11 montre que la quantité d'eau absorb e par jour est en relation avec l'âge de la plante, donc de façon évidente avec son stade de développement. Cependant, au-delà de 75

jours de croissance, la quantité d'eau absorbée diminue de 33% malgré une croissance continue. L'eau absorbée entraîne avec elle l'imidaclopride en solution. La Figure II-12 montre que la quantité accumulée dans la plante est proportionnelle au volume d'eau absorbée par la plante. Comme pour le volume d'eau, la quantité accumulée dans la plante est maximale à 75 jours, $1092 \pm 126 \mu\text{g}$, puis elle diminue à 90 jours, $818 \pm 112 \mu\text{g}$. Cela a permis de déterminer la quantité d'imidaclopride théoriquement absorbée par la plante (Figure II-11). Si l'on compare ces résultats avec les quantités totales de résidus retrouvés dans la plante, ces dernières ne représentent, jusqu'à 75 jours, que 72% de la quantité théorique, et 82% à 90 jours. Il y a donc une absorption limitée de l'imidaclopride par le système racinaire de la tomate.

A l'aide de ces résultats, nous avons calculé le facteur de concentration racinaire (RCF, Root Concentration Factor) pour déterminer la capacité d'absorption de l'imidaclopride par la racine ($\text{RCF} = \text{concentration dans des racines} / \text{concentration dans la solution externe}$).

La concentration dans la solution externe est de $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$, la concentration dans les racines de $6,8 \mu\text{g g}^{-1}$, par conséquent, le RCF est de 2,7.

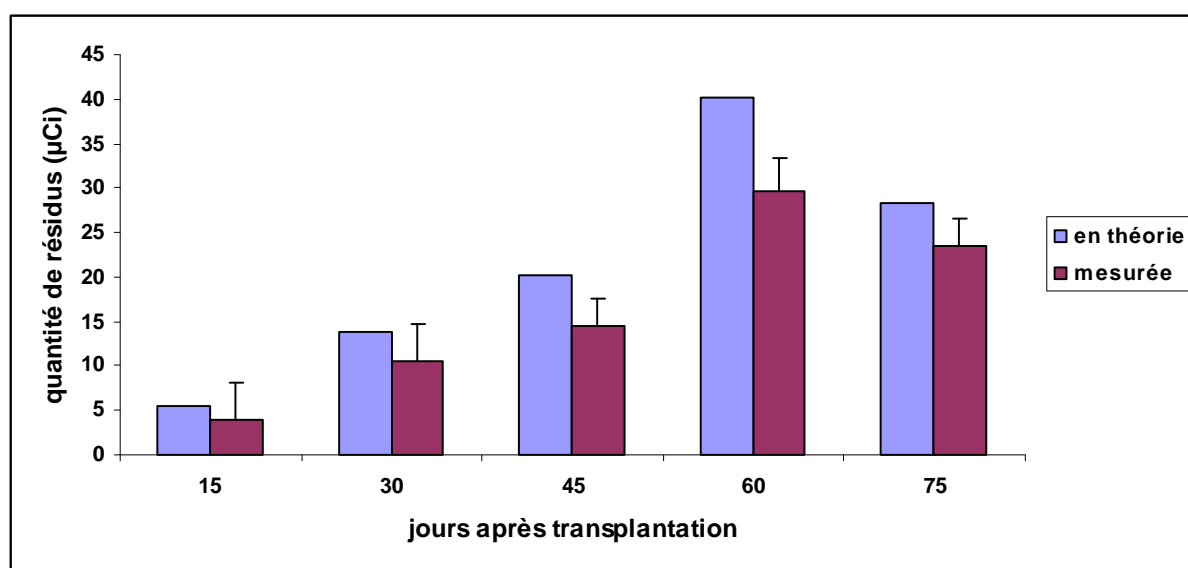


Figure II-11. Quantité de résidus d'imidaclopride dans des plantes de tomate à différents temps (âge de la plante = jours après transplantation + 15).

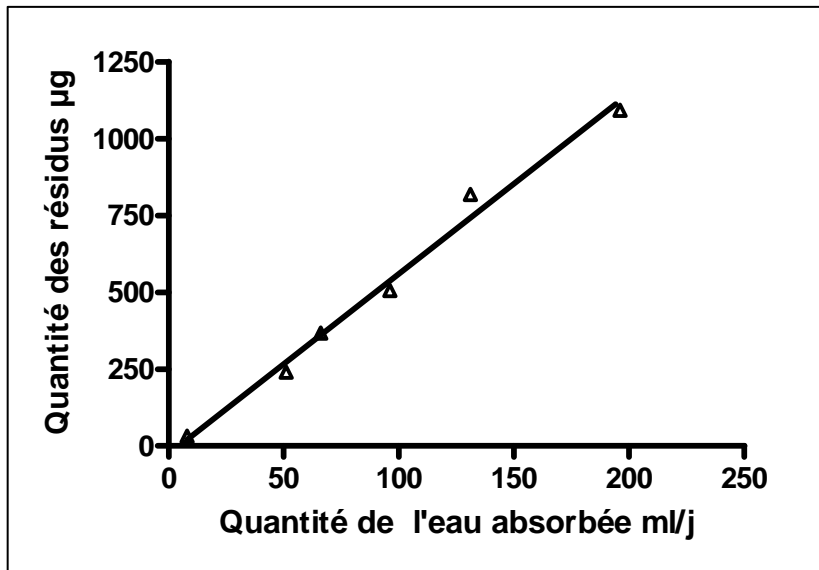


Figure II-12. Relation entre la quantité d'eau absorbée par la plante de tomate et la quantité de résidus.

Après avoir regardé le transfert dû à la transpiration à partir du phénomène d'absorption, nous avons regardé le système par le côté évaporation. Sur une même plante, si on regarde la quantité d'eau transpirée par les feuilles, on voit que la relation avec le poids des feuilles frais ou sec n'est pas étroitement corrélée (Figures II-13.a et b, pente $4,39 \pm 1,09$; $r^2 = 0,67$ et pente $19,78 \pm 7,5$; $r^2 = 0,4621$, respectivement pour le poids frais et le poids sec des feuilles).

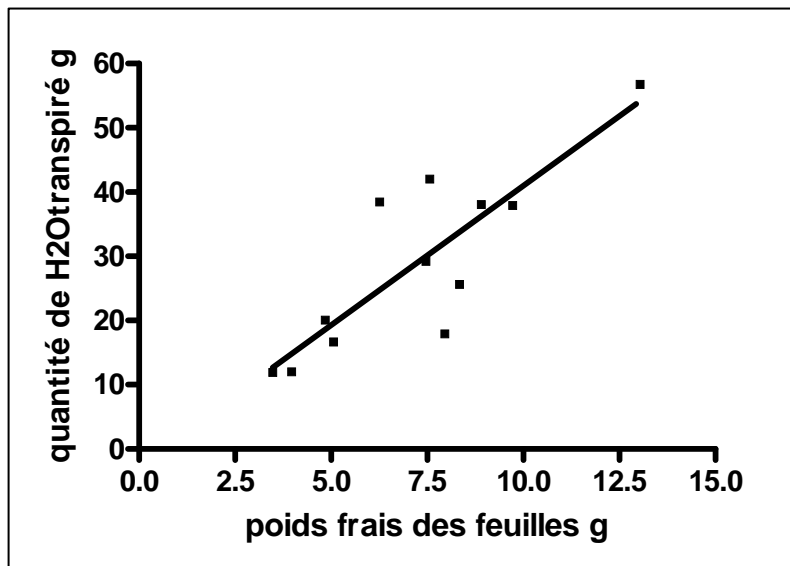


Figure II-13.a. Relation entre le poids frais des feuilles et la quantité d'eau transpirée.

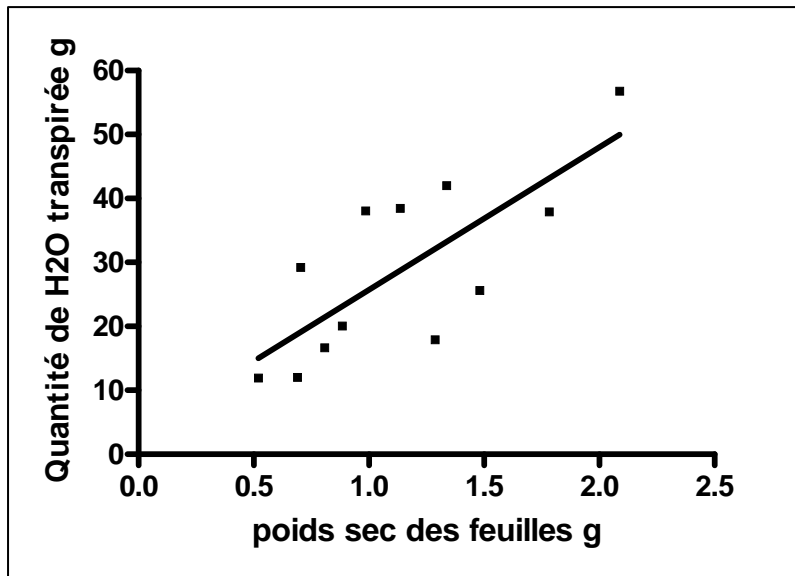


Figure II-13.b. Relation entre le poids sec des feuilles et la quantité d'eau transpirée.

Généralement pour un végétal donné, la quantité d'eau transpirée est fonction de la surface de la feuille. Nous n'avons pas pu mesurer cette surface mais les faibles coefficients de corrélation ne semblent pas permettre de remplacer efficacement la surface par la masse. Lorsque nous relierons la quantité accumulée dans les feuilles à la quantité d'eau transpirée par ces mêmes feuilles (Figure II-14.a) ou à la masse de ces feuilles (Figure II-14.b), nous obtenons une meilleure corrélation que précédemment. Dans tous les cas, le faible nombre d'échantillons nuit peut-être à la qualité des résultats. Cependant, cela montre bien que l'accumulation est reliée au flux xylémien.

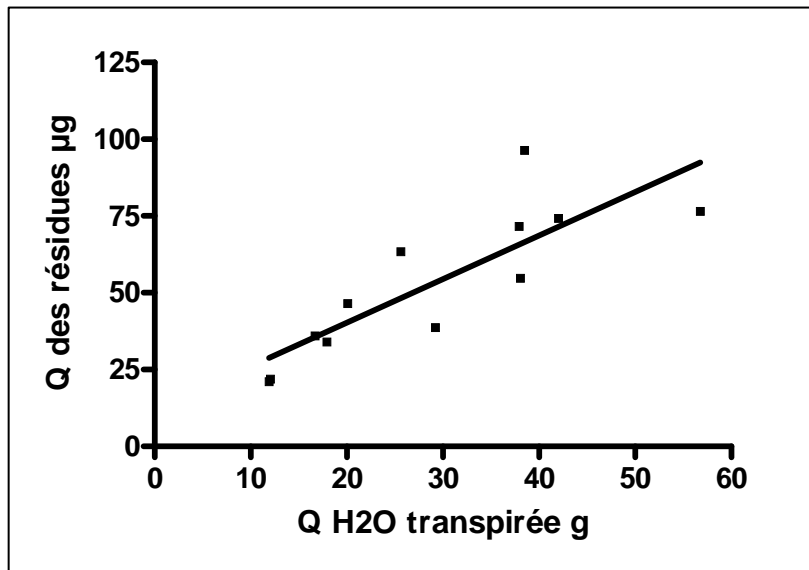


Figure II-14.a. Relation entre la quantité d'eau transpirée et la quantité de résidus dans les feuilles.

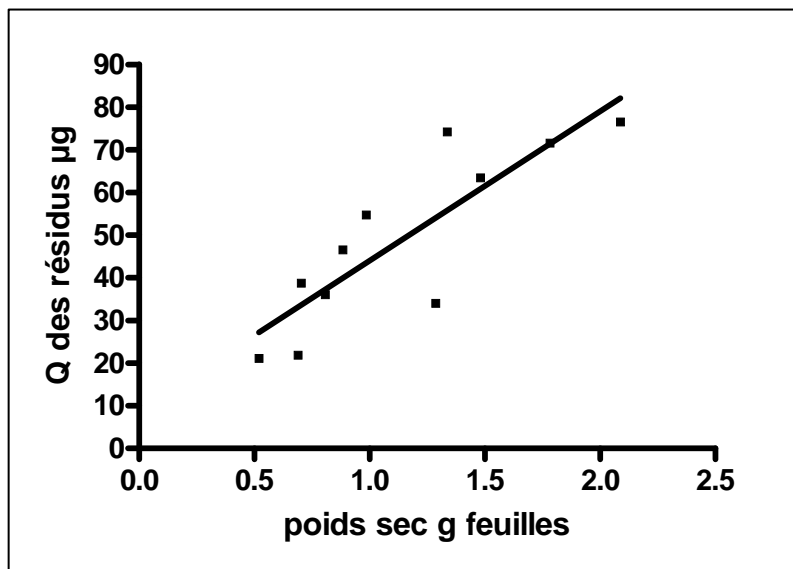


Figure II-14.b. Relation entre le poids sec des feuilles et la quantité de résidus.

Nous avons donc calculé le facteur de concentration dans le courant de transpiration (TSCF, Transpiration Stream Concentration Factor), la capacité de translocation vers les parties aériennes depuis les racines ($\text{TSCF} = \text{concentration dans le xylème} / \text{concentration dans la solution externe}$). Dans cette expérimentation, nous ne connaissons pas la concentration dans le flux xylémien mais cette valeur a été estimée en rapportant la quantité retrouvée dans les feuilles par la quantité d'eau transpirée par ces mêmes feuilles. Comme le transfert de l'imidaclopride dans la plante se fait par voie xylémienne, on peut considérer que ce rapport équivaut à la concentration xylémienne. Le TSCF est donc égal à 0,74. Ce résultat est identique au rapport entre la quantité totale de résidus retrouvés dans la plante, et la quantité théoriquement absorbée en fonction du volume d'eau absorbée.

L'absorption et la transpiration entraînent donc l'accumulation des résidus dans les feuilles. Nous avons vu précédemment, que cette accumulation se traduit au cours du temps par une concentration plus élevée dans les feuilles les plus âgées de la plante. La Figure II-15 montre l'accumulation sur une brève période, des résidus dans les différentes feuilles de la plante. Cette accumulation, sur quelques jours seulement, peut être considérée comme instantanée au regard de la longueur des expérimentations précédentes. Excepté pour les jeunes plantes (15 et 30 jours), on voit que la concentration dans les feuilles augmente presque linéairement en fonction de la position de la feuille et non plus de son âge. La concentration dans les feuilles augmente d'environ 10% entre deux feuilles simultanées.

Dans les fruits, nous avons aussi déterminé la relation entre le poids frais ou le poids sec et la quantité de résidus d'imidaclopride (Figure II-16). Il n'y a pas de relation linéaire entre le poids et la quantité accumulée dans les fruits ($r^2 = 0,537$ et $r^2 = 0,412$, respectivement). Au-delà d'une masse de 2,5 g environ, il y a une saturation de l'absorption alors que lors d'une contamination en début de croissance du végétal, nous avons montré précédemment que taille et quantité étaient linéairement reliées pour les fruits.

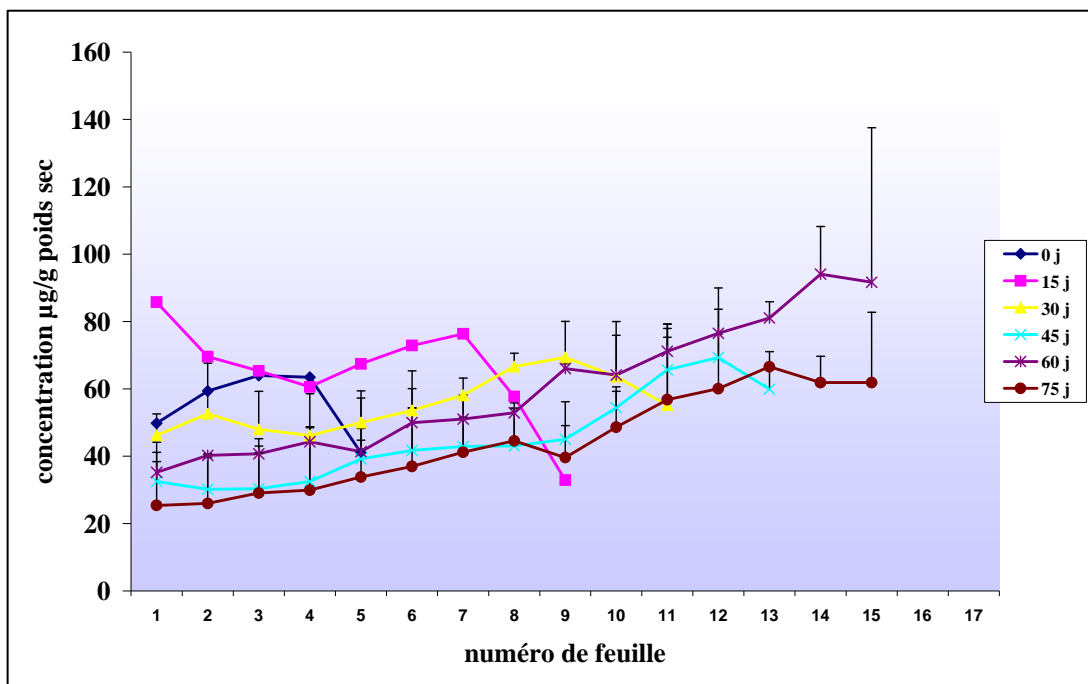


Figure II-15. Concentration des résidus d'imidaclopride dans des feuilles de tomate variant par l'âge.

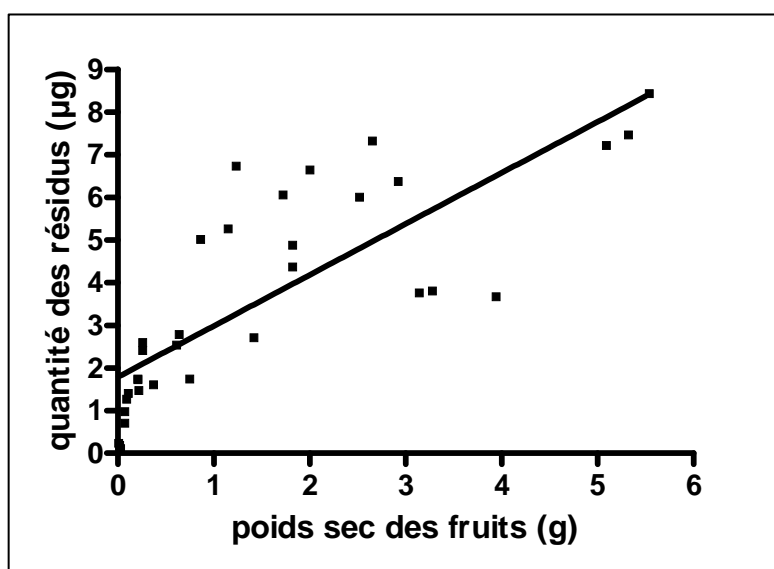


Figure II-16. Relation entre le poids sec des fruits et la quantité de résidus.

4. Discussion

Le taux d'absorption par les plants de tomate des résidus d'imidaclopride du sol a diminué proportionnellement avec l'âge de la contamination de sol, avec une demi-vie de l'ordre de 63 jours. Cette demi-vie est du même ordre que celles données dans la littérature (Rouchaud, 1996 ; Scholtz, 1992). Contrairement aux mesures habituelles de la demi-vie qui ne regardent que le devenir de la molécule parente, elle intègre ici les phénomènes de sorption, adsorption/désorption sur les particules du sol, la dégradation dans le sol et l'absorption des résidus par la plante, sans distinction entre l'imidaclopride et ses produits de dégradation (la structure des composés pris à partir du sol par les plantes n'a pas été déterminée). Par contre, cela détermine bien la biodisponibilité des résidus pour la plante. Alors que la demi-vie, d'une part ne tient pas compte de certains phénomènes de sorption qui peuvent limiter l'accès de la plante à la molécule mère et d'autre part au contraire ne mesure pas le taux de produits de dégradation qui peuvent être absorbés par la plante. Ainsi, dans un contexte de surveillance du risque chimique des résidus, notre mesure de biodisponibilité nous semble une meilleure approche car elle intègre l'ensemble des phénomènes agissant sur le transfert vers la plante. Dans nos conditions expérimentales, entre deux récoltes (période de 15 jours), on a estimé que la biodisponibilité en résidus dans la solution du sol diminue d'environ 12%.

Cette diminution concoure ainsi à accentuer le gradient acropétale trouvé dans les feuilles des tomates. Un tel gradient a été déjà décrit pour l'imidaclopride et est en accord avec une distribution de ce composé par le courant d'évapotranspiration xylémien (Westwood, 1998 ; Laurent, 2003 ; Buchholz, 2001).

Les mesures d'évapotranspiration ont montré que plusieurs facteurs peuvent agir sur la quantité d'imidaclopride et la concentration qui en résulte dans les feuilles. Le premier point est que si la quantité de résidus absorbés dans la plante est bien fonction de la quantité d'eau absorbée, les concentrations finales dans les feuilles ne semblent pas dépendre exclusivement de leur masse ni de leur évapotranspiration. Généralement, le facteur le mieux corrélé à la transpiration est la surface foliaire, ce qui pourrait expliquer la faible corrélation. Mais dans notre cas, nous n'avons pas pu déterminer la surface des feuilles. Cependant, l'âge des feuilles semble un facteur plus adéquat chez la tomate ou plutôt la position des feuilles sur l'axe de la plante ; les deux étant toutefois dépendant l'un de l'autre dans le cas de la tomate où le développement se fait selon un seul axe (les tiges latérales étant systématiquement supprimées). Il est donc difficile de faire la part des choses entre ses deux facteurs.

L'âge de la plante semble aussi jouer un rôle mais l'absence d'un nombre d'individus suffisants n'a pas permis pas d'en déduire une relation nette. Cette augmentation dans la concentration permet au moins d'expliquer en partie l'allure asymptotique des courbes de concentrations en fonction du numéro des feuilles dans les expériences de contamination du sol dès le début de la croissance. Les feuilles apparaissent régulièrement au cours du temps (dans des conditions climatiques constantes) et leur numéro de position sur l'axe peut être exploité comme un facteur relié linéairement au temps. L'accumulation est ainsi proportionnelle à la durée d'exposition et les feuilles les plus âgées sont les plus concentrées. Mais, ce cumul n'est pas linéaire car plus les feuilles sont hautes sur la plante, plus elles absorbent rapidement le composé et donc plus l'accumulation est accélérée, tendant ainsi à compenser une petite partie du retard de croissance.

Dans les fruits, l'accumulation est beaucoup plus faible que dans les feuilles. Certains auteurs ont relié le faible taux de l'accumulation à une adsorption des résidus sur le compartiment apoplastique des vaisseaux xylémiens, ce qui par conséquent réduit le flux de résidus arrivant aux fruits (Trapp, 1995 ; Uchida, 1980 ; McCardy, 1987). Néanmoins, contrairement aux feuilles, la transpiration des fruits de tomate est faible par rapport à leur poids (Guichard, 2005). Le flux xylémien est presque exclusivement employé pour la croissance du fruit. Il ne représenterait seulement qu'un quart du volume du fruit, le reste étant fourni par le phloème (Kawabata, 2005). En conséquence, l'accumulation de résidus d'imidaclopride dans les fruits correspond à la quantité de résidus compris dans ce faible volume, sans accumulation significative due à la transpiration. Cela contribue à une concentration dans les fruits de tomate inférieure à celles des feuilles.

D'autre part, contrairement aux feuilles, l'accumulation dans les fruits quand la source de contamination est présente en permanence, est indépendante de l'âge des fruits et similaire dans tous les fruits. L'accumulation totale semble donc en contradiction avec le flux mesuré dans les expériences d'évapotranspiration où nous observons une saturation de l'accumulation en fonction de l'âge des fruits. Cette absence de relation est probablement due au fait qu'ici la mesure de la quantité d'imidaclopride peut être considérée, comme précédemment pour les feuilles, comme une mesure instantanée du flux et non le résultat du cumul au cours du temps.

La quantité rentrant dans le fruit dépend donc du flux xylémien au moment de l'expérimentation. Or, ce flux instantané va dépendre de la taille du fruit mais aussi de son degré de maturité. Et les deux ne sont pas forcément corrélés.

En effet, le flux xylémien est proportionnel à la taille du fruit en début de croissance mais en cours de croissance, le flux phloémien augmente fortement et à la fin, la masse finale est due pour les trois quarts au phloème. L'ajout des deux flux explique la saturation en fonction de l'âge des fruits observée dans une mesure quasi-instantanée. Sur une plus longue période de contamination, tous les fruits sont contaminés dès le début de leur croissance et jusqu'à la fin. Tous les fruits accumulent donc durant le même temps, environ un mois, et durant le même stade de croissance. De plus, en dépit d'un délai d'environ 10 jours entre l'apparition de deux inflorescences successives, la concentration dans les fruits n'a pas été affectée par la réduction de la biodisponibilité dans le temps. Cela peut s'expliquer par le fait que seulement trois inflorescences consécutives ont été analysées. Il y a seulement un intervalle de 20 jours entre l'apparition de la première et de la troisième, correspondant à une réduction environ de 16% de la biodisponibilité des résidus d'imidaclopride. Cette réduction du flux d'imidaclopride n'était probablement pas suffisante pour provoquer une réduction significative de l'accumulation des résidus dans les fruits poussant sur le troisième bouquet par rapport à ceux du premier.

En conclusion, en raison du caractère typiquement xylème-mobile de l'imidaclopride, la contamination systémique des fruits de tomate résulte de l'entrée de l'eau du xylème dans ceux-ci. La faible concentration en résidus était due à la petite quantité d'eau apportée par le flux du xylème dans le fruit de tomate. Malgré la réduction du flux du xylème se produisant vers la fin de la croissance du fruit au bénéfice du phloème, l'étape de la maturation n'influence pas l'accumulation totale dans le fruit.

CHAPITRE III

ABSORPTION ET TRANSFERT DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE APRES TRAITEMENT FOLIAIRE

III. ABSORPTION ET TRANSFERT DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE APRES TRAITEMENT FOLIAIRE

1. Introduction

Le transport des photoassimilats et d'autres petites molécules sur de longues distances par la sève élaborée se fait dans les tissus du phloème. Les composantes principales de ces tissus résident dans les tissus conducteurs, appelés éléments criblés. Les tubes criblés qui, à maturité, contiennent un protoplasme modifié mais actif, sont aboutés et séparés à leurs extrémités par des parois perforées nommées plaques criblées. Le sens de la migration des photoassimilats dans le phloème est largement déterminé par les relations sources/puits.

Décider qu'un organe ou un tissu constitue une source ou un puits dépend du sens dans lequel s'effectue le transport net des photoassimilats (Ho, 1988 ; Dickson, 1991). Un organe ou un tissu qui produit plus de photoassimilats qu'il n'est nécessaire pour maintenir son activité métabolique ou sa croissance est une **source**. Une source est donc un producteur ou un exportateur net autrement dit, il exporte plus de photoassimilats qu'il n'en importe. Les feuilles adultes et tous les autres tissus qui ont une photosynthèse active constituent les principales sources chez la plupart des plantes. A l'inverse, un **puits** est un importateur ou un consommateur net de photoassimilats. Les racines, les tissus de la tige et les fruits en cours de développement sont les tissus ou les principaux organes qui se comportent comme des puits. Le principe qui régit le transport par le phloème est le suivant : les photoassimilats sont transportés d'une source vers un puits. Les organes-puits utilisent les photoassimilats soit en les faisant entrer dans leur métabolisme respiratoire, soit en les utilisant pour structurer leurs cellules et leurs cytoplasmes, soit enfin pour les mettre en réserve sous forme d'amidon ou d'autres glucides. Tout organe, à un moment donné de son développement, exercera une fonction de puits ou pourra passer de l'état de puits à celui de source. Les feuilles en sont un excellent exemple. Au cours des premiers stades de son développement, une feuille se comportera en puits attirant les photoassimilats produits par les feuilles les plus âgées afin d'alimenter sa forte activité métabolique et pour subvenir à une croissance rapide. Cependant, lorsqu'une feuille acquiert peu à peu sa taille définitive et que sa vitesse de croissance décroît, ses besoins en métabolites diminuent, elle se transforme alors progressivement en exportateur.

La feuille adulte sera ensuite une source de photoassimilats destinés aux puits répartis dans d'autres parties de la plante. La transformation d'une feuille de puits en source est un processus progressif qui accompagne la maturation des tissus foliaires.

Le chargement et le déchargement du phloème jouent un rôle essentiel dans la régulation de la vitesse du transport et dans la répartition des photoassimilats entre les différents puits. Les mécanismes de chargement et de déchargement du phloème présentent des sites potentiels d'intervention sur la distribution des photoassimilats et, finalement, sur le rendement de cultures. Les photoassimilats sont transportés des cellules photosynthétiques du mésophylle dans les éléments criblés au niveau de la source (**chargement du phloème**) ou des tubes criblés aux cellules des puits (**déchargement du phloème**).

Le cheminement des photoassimilats des sites où s'effectue la photosynthèse jusqu'aux tubes criblés n'est pas long. La plupart des cellules du mésophylle sont situées à quelques dixièmes de millimètres, au plus trois ou quatre cellules, de l'extrémité d'une petite nervure où se fera le chargement des assimilats dans le **complexe tube criblé–cellule compagne** (Dickson, 1991).

Il est généralement admis que le saccharose migre des cellules du mésophylle vers le phloème, probablement vers les cellules parenchymateuses du phloème, par diffusion à travers le plasmodesme (c'est à dire par le symplasma) et ce mouvement est rare chez la tomate. Depuis le parenchyme phloémien, deux voies sont possibles pour atteindre le complexe tube criblé-cellule compagne (Figure III-1).

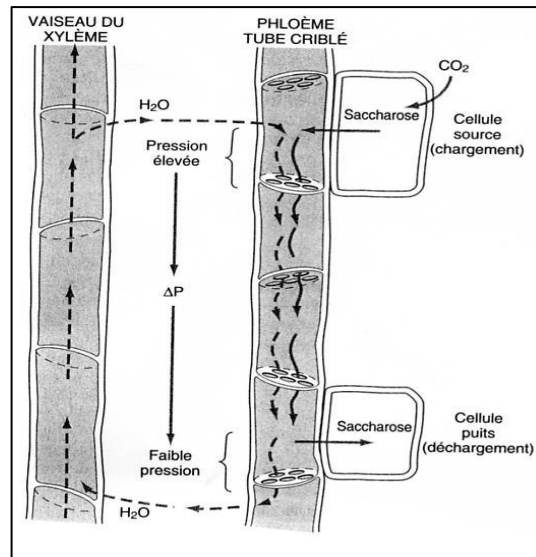


Figure III-1. Schéma représentant l'écoulement sous pression. Le chargement des glucides dans le tube criblé adjacent à la cellule source provoque une absorption osmotique d'eau des éléments du xylème qui sont proches (d'après Hopkins, W. G., 1999).

Le saccharose peut poursuivre sa migration par les plasmodesmes et parvenir directement dans le complexe tube criblé–cellule compagne. Cette voie est la voie symplastique. Sinon, il peut être transporté à travers la membrane des cellules du mésophylle et libéré dans la solution de la paroi cellulaire (apoplasme). Puis, il devra être absorbé au niveau de la membrane du complexe tube criblé–cellule compagne et se retrouver dans le courant de transport à distance. Cette voie est appelée voie apoplastique.

La répartition des photoassimilats entre les différentes voies métaboliques et les différents organes se fait par l'allocation et la distribution. L'allocation représente le devenir métabolique immédiat des photoassimilats. Elle peut permettre de répondre aux besoins immédiats de la feuille elle-même et permettre la conservation de sa biomasse ; l'allocation permet aussi de mettre les photoassimilats en réserve pendant le déroulement de la photosynthèse ou de les exporter de la feuille. Une fois exportés, les photoassimilats peuvent être distribués entre les puits qui sont en compétition les uns avec les autres.

La distribution de carbone nouvellement assimilé entre les puits en compétition est déterminée par la force du puits, la répartition des photoassimilats entre les différents puits étant connue essentiellement sous le terme de distribution. La distribution des photoassimilats entre des puits en compétition est sous la dépendance de trois facteurs : la nature des connexions vasculaires entre source et puits, l'éloignement du puits de la source et la force du puits. La translocation est nettement facilitée par l'existence de connexions vasculaires directes entre la feuille source et le puits. L'un des facteurs les plus importants qui détermine le sens du transport est la **force du puits**. Celle-ci consiste en sa capacité à accumuler des métabolites (Waring et Patrick, 1975) et correspond au produit de la taille du puits par son activité :

$$\text{Force du puits} = \text{taille du puits} \times \text{activité du puits}$$

La taille du puits est représentée par sa masse totale, habituellement exprimée en masse de matière sèche. L'activité du puits est représentée par la vitesse d'absorption ou par le prélèvement des photoassimilats par unité de matière sèche et par unité du temps.

En définitive, les deux voies principales pour la pénétration d'un xénobiotique dans la plante sont les racines et les feuilles selon les caractéristiques physico-chimiques de la substance ; à l'intérieur de la plante, la circulation du xénobiotique depuis les racines vers les feuilles sera assurée par la sève brute, et depuis les feuilles vers les autres organes de la plante par la sève élaborée.

La sève brute, qui contient majoritairement l'eau du sol ainsi que les sels minéraux nécessaires à la photosynthèse, circule dans le xylème depuis les racines jusqu'aux feuilles, où se produit la photosynthèse. Le gradient hydrique existant entre les racines et les feuilles est à l'origine d'un courant d'évapotranspiration qui est le moteur de cette circulation. Les xénobiotiques solubles dans l'eau suivront par convection ce flux et pourront atteindre la feuille, c'est le cas des pesticides systémiques xylémiens.

Les xénobiotiques sont soumis dans les plantes à des réactions variées, la métabolisation, qui génère des résidus ou métabolites. Certains de ces métabolites, tels que certains glycoconjugués, pourraient avoir des caractéristiques physico-chimiques assez proches des substrats photosynthétiques, notamment en termes de polarité. En l'absence d'organe d'excrétion, ceux-ci sont stockés dans la plante, les sites de stockages étant les vacuoles et les parois cellulaires.

Certains travaux récents suggèrent que le stockage vacuolaire est transitoire et les métabolites pourraient ainsi être remis en circulation dans le milieu cellulaire, c'est le phénomène de remobilisation métabolique. Ce phénomène pourrait être en relation avec la mobilisation des photoassimilats photosynthétiques lors du transfert de ceux-ci de leur site de biosynthèse où ils sont stockés, les feuilles matures, vers les puits photosynthétiques où ils sont utilisés, tissus en croissance et fruits.

2. Traitement Foliaire

2.1. Méthodes

2.1.1. Autoradiographie

Des plantules de tomate âgées de 15 jours après l'émergence ont été laissées dans le sol et traitées sur la deuxième feuille à l'aide d'un pinceau par 5 µl d'une solution de Confidor® contenant 1 mg d'imidaclopride et 10 µCi de [¹⁴C] imidaclopride. Les plantules ont été placées dans une armoire climatisée (25/19 °C, jour/nuit, photopériode de 16 h et 350 µ Einstein m⁻² s⁻¹ PAR) durant 8 h, 1, 3 et 7 jours. A la récolte, la feuille traitée a été lavée à l'acétone puis séchée avec un papier absorbant. Des plantules ont alors été placées dans une cassette d'exposition de Phosphor-Imager. Après un mois d'exposition, les images ont été développées à l'aide du Phosphor-Imager (modèle 445SI, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) pour visualiser la distribution de la radioactivité dans la plante.

2.1.2. Traitement foliaire ciblé

Quatre plantes, comportant trois bouquets floraux dont le premier et le deuxième avaient des fruits verts de différentes tailles et le troisième était en cours de floraison (stade anthèse), ont été traitées localement sur les feuilles situées entre les premier et deuxième bouquets floraux (feuilles 10 à 12). Les feuilles ont été traitées à l'aide d'un pinceau avec une solution radiomarquée contenant 5 µl de Confidor® (1 mg d'imidaclopride) et 10 µCi par plante dans 750 µl d'eau. Pour éviter la contamination directe des fruits, ces derniers ont été protégés par des sachets plastiques.

Les fruits du 1er et 2ème bouquet ont été récoltés 10 jours après le traitement et les fruits du troisième 22 jours après. La récolte a été faite au moment où les fruits ont atteint leur taux de croissance maximum, environ 45 mg de poids sec par jour (18,4 jours après anthèse) (Wolterbeek, 1987).

2.1.3. Remobilisation

Des plantes de tomate âgées de 19 jours portant 9 feuilles ont été débarrassées du sol dans lequel elles poussaient puis les racines ont été bien lavées à l'eau. Ensuite, chaque plante a été mise dans 50 ml d'une solution contenant 1000 µg d'imidaclopride froid et 20 µCi d'imidaclopride radiomarqué.

Après absorption totale de la solution (environ 24 h), les plantes ont été transplantées dans un sol constitué d'un mélange de terre et de sable (50:50, p/p) puis placées sous la serre. Après 78 jours, les plantes ont été récoltées en séparant les différentes parties qui ont été analysées comme précédemment.

2.2. Résultats

2.2.1. Autoradiographie

L'autoradiographie (Figure III-2) des plantules dont une seule feuille est traitée par le [¹⁴C] imidaclopride montre une distribution de la radioactivité dans l'ensemble de la plante. Toutefois, l'essentiel du marquage se trouve dans la feuille traitée avec une accumulation préférentielle de la radioactivité sur les pourtours du limbe foliaire. Cette distribution dans la feuille traitée, due au courant d'évapotranspiration, est caractéristique d'un soluté xylémien. Par contre, le faible transfert de radioactivité hors de la zone traitée vers le reste de la plante n'est pas dû au flux xylémien. En effet, les solutés ne peuvent sortir de la feuille que par les faisceaux phloémiens.

Ce transfert de l'imidaclopride ou de ses résidus, des feuilles vers d'autres parties de la plante, a été étudié sur des plantes adultes afin de déterminer s'il existe un transport secondaire, autre que le transport xylémien de l'imidaclopride ou de ses résidus, depuis les feuilles vers les fruits.

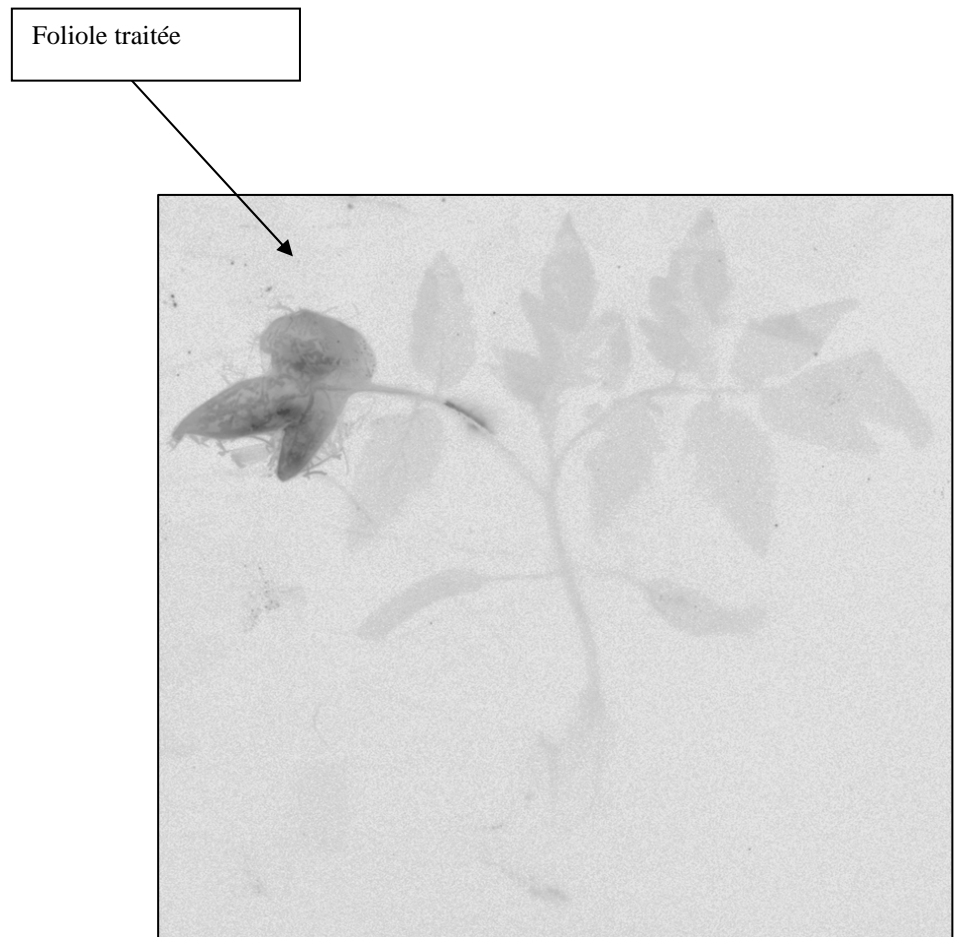


Figure III-2. Autoradiographie d'un plant de tomate 7 jours après le traitement de la foliole terminale d'une feuille par une solution de [^{14}C] imidaclopride.

2.2.2. Traitement ciblé

Dix jours après traitement, des résidus d'imidaclopride sont détectés dans les fruits des deux premiers bouquets floraux. Dix-neuf % de la dose appliquée sur les feuilles sont absorbés par celles-ci. Et sur cette quantité, 97% sont retrouvés dans les feuilles traitées (Figure III-3). Le reste se répartit soit dans les parties supérieures, soit dans les parties inférieures y compris dans les racines.

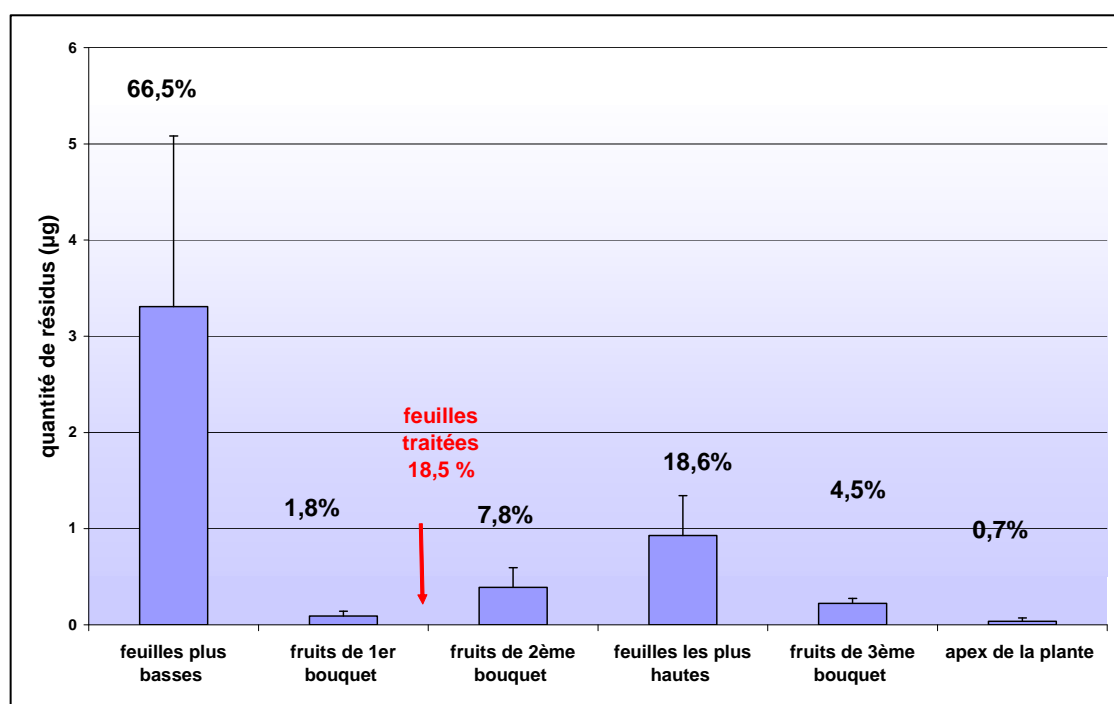


Figure III-3. Quantité de résidus d'imidaclopride dans les différentes parties de la plante de tomate après le traitement foliaire.

La Figure III-3 montre la répartition de la radioactivité transférée hors des feuilles traitées. Ces résultats confirment qu'il existe un transfert de résidus d'imidaclopride depuis les feuilles traitées vers les fruits et que ce transfert peut s'effectuer dans les deux directions, basipétale et acropétale donc soit par voie xylémienne, soit par voie phloémienne.

Les concentrations obtenues dans les différents organes montrent que les feuilles absorbent beaucoup plus de radioactivité que les fruits (Figure III-4). De plus, les concentrations retrouvées dans les parties supérieures sont plus élevées que dans la partie basse de la plante, malgré une quantité transférée plus faible vers le haut de la plante (31,6% de la quantité absorbée).

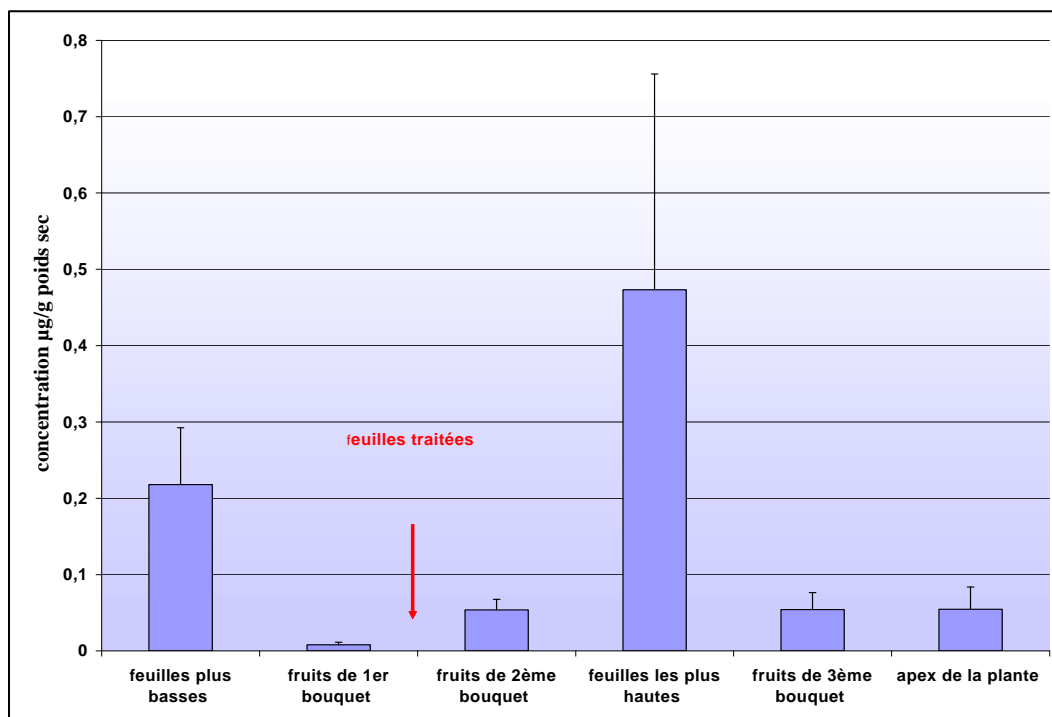


Figure III-4. Concentration de résidus d'imidaclopride dans les différentes parties de la plante de tomate après le traitement foliaire.

2.2.3. Remobilisation

Dans ces expériences, la source de contamination est toujours présente. Bonmatin et al. 2003 indiquent, qu'après une période de stockage dans les feuilles consécutive aux traitements, l'imidaclopride ou ses résidus pourraient être déstockés des feuilles et transloqués dans d'autres parties de la plante, notamment les parties hautes du végétal, expliquant un rebond des concentrations dans ces dernières. Nous avons étudié cette possibilité qui pourrait être une source secondaire de contamination des fruits.

La quantité totale des résidus retrouvés dans les plantes de tomate 78 jours après l'arrêt du traitement est de $615 \pm 94 \mu\text{g}$ par plante (61,5% de la dose appliquée sur les racines). Le maximum de la radioactivité absorbée est détecté dans la partie de la plante déjà existante au moment du traitement : racines, tige et feuilles les plus basses (numéro 1-9) et représente 99% du total (Figure III-5).

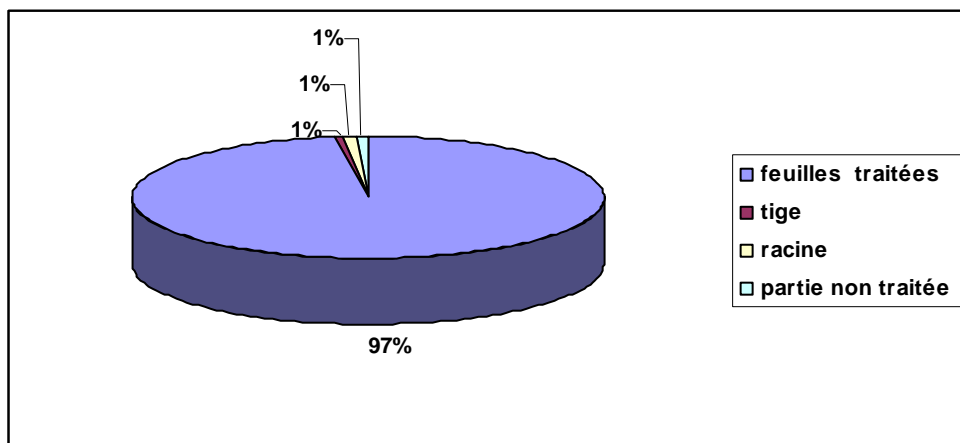


Figure III-5. Répartition des résidus d'imidaclopride dans les différentes parties des plantes de tomate lors de l'essai de remobilisation.

Une faible quantité des résidus, environ 1%, est détectée dans les parties apparues après l'arrêt du traitement. Ce qui semble montrer un transfert de résidus de la partie de la plante ayant accumulé les résidus durant le traitement vers les parties non traitées, parties s'étant développées postérieurement à l'arrêt du traitement. La remobilisation est cependant très faible. La quantité retrouvée dans les feuilles est de $2,6 \mu\text{g}$ soit 44,5% de la quantité totale remobilisée ; 49,8% de la quantité transférée se retrouve dans les fruits, soit $2,9 \mu\text{g}$. Comme précédemment, les concentrations dans les fruits sont inférieures à celles dans les feuilles (Figure III-6).

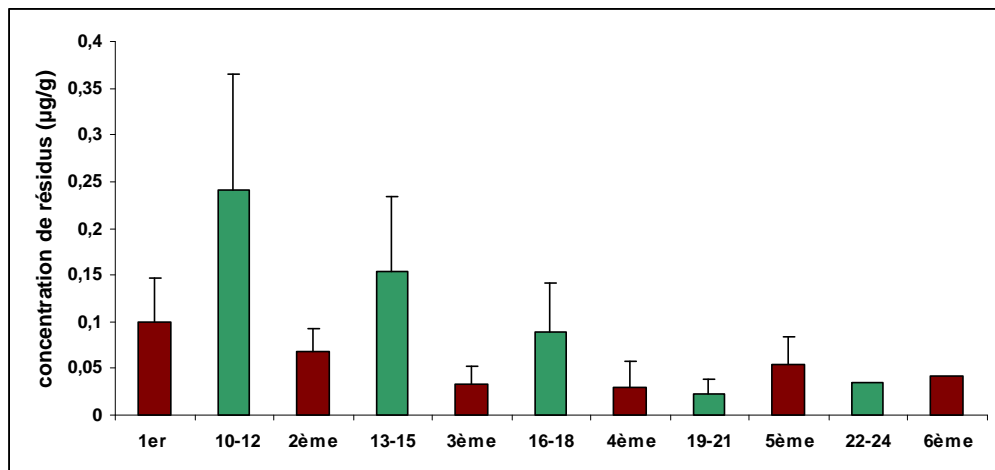


Figure III-6. Concentration des résidus d'imidaclopride dans les différentes parties développées après la transplantation de plantes chargées en [^{14}C] imidaclopride, en rouge : fruits des bouquets n à n+x, en vert : feuilles.

3. Inactivation du phloème

Nos expérimentations précédentes ont montré qu'une partie des résidus d'imidaclopride devait être transportée dans la plante par le phloème. Afin de déterminer si les fruits pouvaient être contaminés par cette voie, nous avons étudié la contamination des fruits après inactivation thermique du phloème.

D'après Lang (1990), la croissance G_1 d'un fruit peut s'écrire selon l'équation :

$$\text{Croissance} = \text{Flux entrant} - \text{Flux sortant ou } G_1 = P + X + T$$

X et P représentent respectivement les flux xylémien et phloémien, et T les pertes d'eau par transpiration. Alors la croissance G_2 d'un fruit dont le phloème pédonculaire aura été détruit devient :

$$G_2 = X + T$$

De la même façon, la croissance G_3 d'un fruit détaché de la plante :

$$G_3 = T$$

Il est alors possible d'obtenir les valeurs de P et X par les équations :

$$P = G_1 - G_2 \text{ et } X = G_2 - G_3$$

Le transfert de l'imidaclopride et de ses résidus par le xylème étant prépondérant dans le mouvement des résidus dans la plante quand la contamination a lieu à partir du sol, nous avons essayé d'étudier la contamination des fruits à partir d'un traitement foliaire. Cela pourrait mettre en évidence un éventuel transfert phloémien vers les fruits comme les précédents résultats le laissent supposer. Dans ce but, nous avons détruit thermiquement le phloème de certains bouquets floraux.

Pour étudier le bilan de croissance ou de flux d'un fruit avec cette méthode, il faut donc disposer au minimum d'une triplette de fruits, c'est-à-dire d'un fruit témoin attaché à la plante, d'un fruit sans phloème pédonculaire attaché à la plante et d'un fruit ayant été détaché de la plante.

La tomate n'est pas une espèce lignifiée comme les arbres fruitiers et de plus le pédicelle a la particularité de posséder un système de vascularisation phloémien double : un externe et aussi un interne, localisé au centre du xylème. De ce fait, la méthode de destruction du phloème basée sur la décortication du pédicelle, habituellement utilisée sur les arbres fruitiers n'est pas possible. Nous avons donc employé la méthode utilisée par Guichard et al. (2005) consistant à détruire thermiquement les faisceaux phloémiens.

Ces derniers, constitués de cellules vivantes, sont inactivés pour des températures supérieures à 50 °C alors que les faisceaux xylémiens ne sont pas sensibles à la chaleur, de manière raisonnable, car ce sont des cellules mortes.

3.1. Méthodes

3.1.1. Inactivation thermique du phloème

Un fil de Stabilohm 110 (80/20 Ni/Cr) de diamètre 4,8 µm et de 80 cm de longueur a été enroulé en deux couches superposées autour du pédicelle choisi. Le passage d'un courant électrique (0,2 A, 15V) dans le fil pendant 2,8 min a permis d'atteindre le cœur du pédicelle à une température de 70° C pendant quelques secondes, suffisantes pour détruire sélectivement le tissu phloémien.

Afin de vérifier si le phloème a été bien inactivé et ceci sans toucher la structure des vaisseaux du xylème, des coupes transversales de pédicelle ont été réalisées à l'aide d'un microtome manuel. Les coupes ont ensuite trempées dans de l'eau de Javel durant 15 minutes.

Après deux lavages à l'eau distillée, les coupes ont été mises pendant dix minutes dans une solution à 1% d'acide acétique. Puis, les coupes ont été colorées 20 secondes dans une solution à 0,5% de vert d'iode. Cette coloration est lavée par l'alcool éthylique à 90%, plusieurs fois jusqu'à disparition de l'excédent de vert. A ce stade, les éléments lignifiés sont colorés et l'intégrité de leurs structures peut être vérifiée. Les coupes ont été ensuite colorées dans du carmin aluné pendant 15 minutes. La destruction du phloème (absence de coloration rose) et l'intégrité des vaisseaux du xylème sont vérifiées sous microscope.

3.1.2. Détermination de la transpiration des fruits

Des fruits de tomate ayant un degré de maturité variable (rouge, orange et vert) ont été récoltés. Immédiatement, une petite quantité de graisse de silicone a été déposée sur la cicatrice du pédicelle pour éviter le dessèchement du fruit par cette voie. Chaque fruit a été ensuite pesé et remis dans le phytotron dans les mêmes conditions que les plantes de tomates servant à l'expérimentation « inactivation du phloème ». Après une semaine, les fruits ont été pesés individuellement pour déterminer la quantité d'eau transpirée par les fruits.

3.1.3. Protocole des essais

L'apex de plantes de tomate, de même âge (environ 60 jours) ayant poussé en conditions contrôlées, a été excisé après la première feuille située au-dessus de la 2^{ème} inflorescence.

Le phloème du 1^{er} ou du 2^{ème} bouquet a ensuite été inactivé thermiquement. Puis, les trois feuilles situées entre ces deux bouquets ont été contaminées à l'aide d'un pinceau avec 1,5 ml d'une solution aqueuse contenant 1 mg d'imidaclopride (Confidor®) et 10 µCi de [¹⁴C] imidaclopride par plante (Figure III-7).

Les fruits ont été récoltés sept jours après la suppression de phloème, puis pesés, congelés, lyophilisés et broyés à l'aide d'un broyeur à bille, comme lors des expérimentations précédentes. Une aliquote de chaque fruit a été prélevée et brûlée à l'oxidizer pour déterminer la radioactivité absorbée.

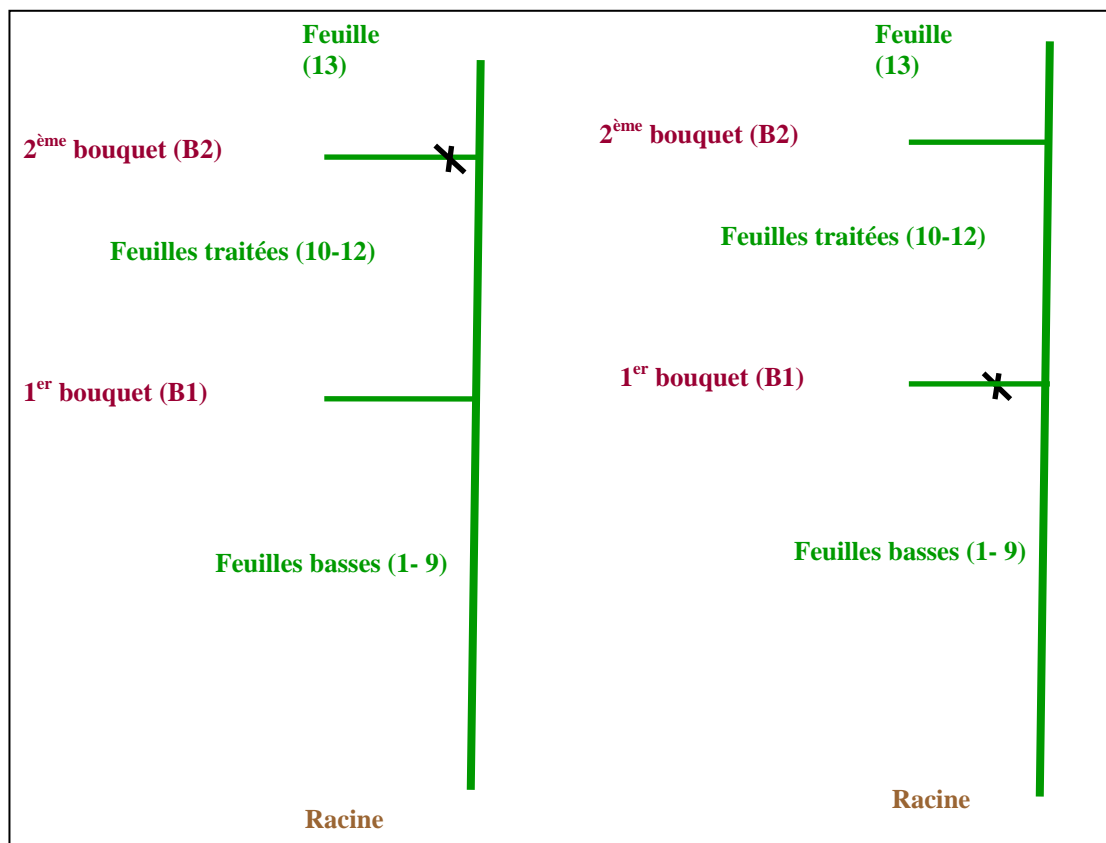


Figure III-7. Schéma montrant la position de l'inactivation thermique du phloème du premier ou du deuxième bouquet.

3.2. Résultats

3.2.1. Inactivation du phloème et traitement foliaire

Nous avons comparé le transfert à partir des feuilles vers les fruits après l'inactivation du phloème des bouquets situés soit au-dessus, soit en-dessous du site de traitement. Deux séries de comparaisons ont été effectuées.

Dans la Figure III-8, nous avons comparé les quantités transférées vers les bouquets 1 avec ou sans phloème inactivé (Figure III-8.a) ou les bouquets 2 dans la même situation (Figure III-8. b). Dans les deux cas, l'inactivation du phloème (situation X) entraîne une réduction du transfert vers les fruits. Ceci démontre qu'il existe bien une translocation phloémienne des résidus vers les fruits comme cela était suggéré par les résultats précédents.

La comparaison des bouquets 1 et 2 situés sur les mêmes plantes mais après inactivation du phloème de l'un ou l'autre des bouquets montre que le résultat dépend du bouquet inactivé.

Lorsque le phloème du bouquet 2 (Figure III-9.a) est détruit, il n'existe pas de différence entre les quantités présentes dans les fruits. Par contre, lorsque le phloème du bouquet 1 est inactivé (situation X) (Figure III-9.b), les quantités qui pénètrent dans ses fruits sont inférieures à celles des fruits du bouquet 2 dont le phloème est indemne (situation X+P).

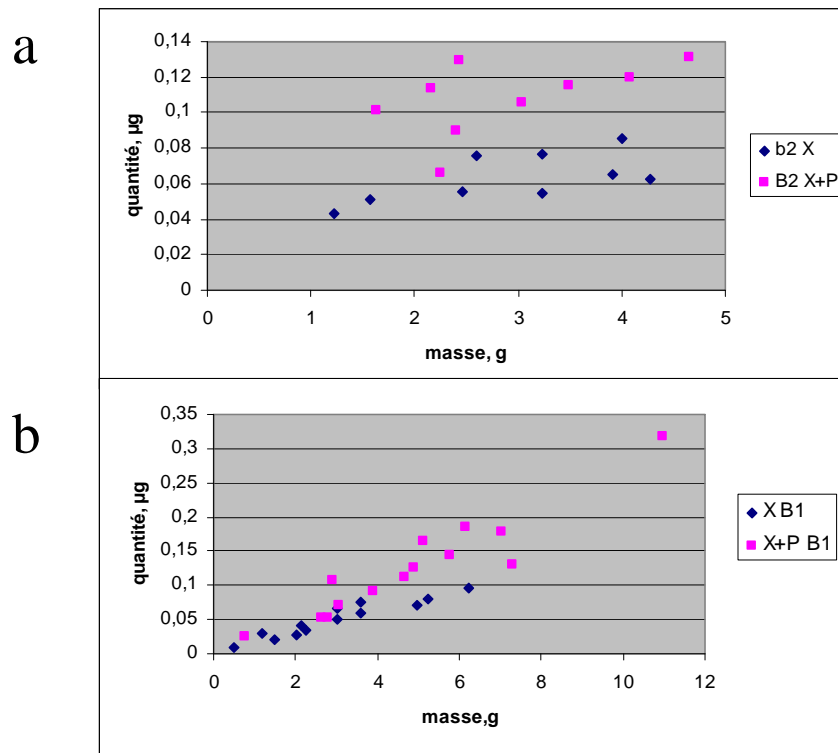


Figure III-8. Comparaison des flux de résidus entrant dans les fruits
a. du 2ème bouquet ; **b.** du 1er bouquet après inactivation du phloème (X)
ou non (X+P).

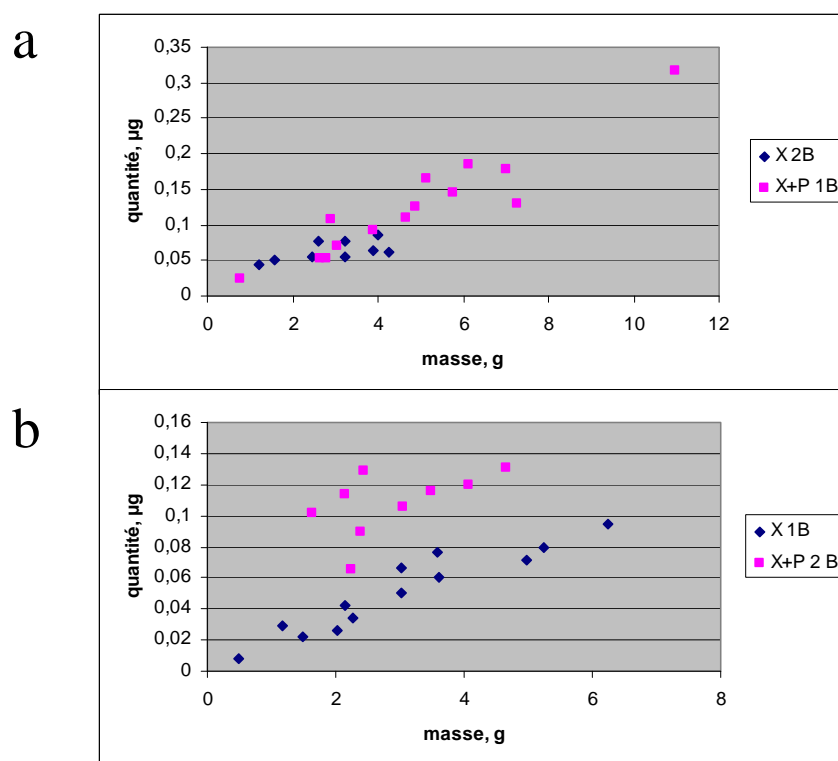


Figure III-9. Comparaison des flux de résidus entrant dans les fruits du 1^{er} et du 2^{ème}
bouquet après inactivation du phloème
a. du bouquet 2 ; **b.** du bouquet 1. X : xylème ; P : phloème.

3.2.2. Transpiration des fruits

Quel que soit le degré de maturité des fruits, les masses avant et après sept jours ne sont pas significativement différentes (tableau III-1). Par conséquent, la transpiration des fruits de tomate est très faible, représentant environ 1,5% de perte de masse en sept jours.

Tableau III-1 : Transpiration des fruits 7 jours après la séparation de la plante. n = 8.

	Degré de maturité		
Masse, g	Vert	Orange	Rouge
A la récolte	38,40 ± 19,42	77,32 ± 19,37	82,25 ± 16,47
A + 7 jours	37,89 ± 19,21	76,15 ± 18,68	81,20 ± 16,68
Eau évaporée	0,51	1,17	1,05

4. Discussion

Après avoir traité les feuilles de la plante avec une solution contenant l'imidaclopride radiomarké, des résidus sont détectés dans toutes les parties de la plante situées tant en-dessous qu'au-dessus de la partie traitée. Ainsi, l'imidaclopride et ses résidus ont la capacité d'être transférés dans la plante dans les deux directions basipétale et acropétale. L'imidaclopride et ses résidus ont la capacité de se déplacer dans le phloème (symplaste) alors que ce produit, comme le montre sa distribution dans la plante après son absorption par les racines, a une systémie principalement apoplastique ou xylémienne.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Mukherjee (2000) qui a montré qu'après avoir pulvérisé des plants d'aubergine (*Solanum melongena* L.) avec de l'imidaclopride avant la formation de certains fruits, il y avait transfert des résidus d'imidaclopride depuis les feuilles traitées vers les fruits formés après le traitement. La « remobilisation » des résidus reste toutefois très faible et ne doit pas avoir de conséquences importantes sur les transferts dans la partie végétative où s'accumule la majorité des résidus en raison du courant d'évapotranspiration.

Comme cela avait déjà été montré par d'autres équipes (Guichard, 2005), la transpiration des fruits de tomates est très faible. Par conséquent cette perte d'eau ne peut, contrairement à l'accumulation foliaire, être l'élément principal de l'accumulation de résidus dans le fruit de la tomate.

L'absence d'évapotranspiration suffit donc probablement à expliquer les faibles concentrations rencontrées dans les fruits. Dans les fruits, certains auteurs relient le faible taux d'accumulation à la rétention des résidus par le xylème.

Les résidus s'adsorbant sur l'apoplaste des vaisseaux xylémiens, ils ne peuvent pas être transférés dans les fruits (Trapp, 1995 ; Uchida 1980 ; McCardy, 1987). Nous montrons ici que cette hypothèse n'est pas valable dans le cas des tomates, et que la faiblesse du flux du courant de transpiration dans le fruit suffit à obtenir ce faible taux de résidus.

Toutefois, le flux xylémien n'est pas le seul mécanisme de transfert des résidus. Pour les parties végétatives, à cause de l'importance du flux xylémien dans les feuilles, le transfert par voie phloémienne est mineur particulièrement, pour une molécule comme l'imidaclopride dont la systémie principale est xylémienne. Par contre dans le cas des fruits, ce transfert phloémien secondaire pourrait devenir important pour l'accumulation de résidus.

Ainsi, lorsque le tissu phloémien est inactivé, cela entraîne un transfert plus faible des résidus d'imidaclopride dans les fruits. Cependant, la distribution basipétale des résidus semble plus influencée par l'inactivation du phloème que la distribution acropétale. De telles images de distribution différenciée dans la plante sont obtenues pour des composés endogènes tels que la citruline (Mohr and Schopfer, 1994). Mais cette distribution différentielle est le résultat du déchargement du phloème dans les tissus puits, qui se fait par l'intermédiaire de transporteurs membranaires spécifiques au niveau des cellules de ce puits. L'existence ou non de ces transporteurs conditionne le sens apparent du transport. Or, le transfert cellulaire des résidus de pesticides se fait par diffusion passive sans l'action de transporteur. De ce fait, le transfert phloémien des résidus doit être comme dans le cas du glyphosate, bidirectionnel sans déchargement spécifique dans un tissu plus particulier.

Cette sélectivité apparente du flux de résidus peut toutefois être expliquée par la valeur des flux xylémien et phloémien et de leur importance relative. En effet, le sens du flux xylémien est acropétale alors que la circulation phloémienne est bidirectionnelle. De ce fait, le poids relatif du phloème par rapport au xylème est plus grand dans le sens basipétale.

Des simulations avec des valeurs discrètes des différents flux montrent que pour obtenir les résultats trouvés lors des expérimentations, le flux phloémien entrant dans le fruit doit être équivalent au flux xylémien.

Cette situation semble de plus expliquer le fait qu'au cours de la croissance des fruits, malgré une modification physiologique de l'importance relative des faisceaux xylémiens et phloémiens et de la saturation du flux xylémien des résidus rentrant dans le fruit, la concentration en résidus ne semble pas varier en fonction de leur degré de maturité.

D'autres expérimentations seront nécessaires pour ajuster les valeurs relatives réelles des flux phloémien et xylémien ainsi que des flux phloémiens acropétale et basipétale.

D'autre part, bien que le flux xylémien soit uniquement acropétale, un transfert xylémien apparemment basipétale peut cependant apparaître. En effet, les contenus du phloème et du xylème sont en équilibre avec les tissus environnants et un échange permanent entre les flux des deux faisceaux existe pour les molécules pouvant pénétrer dans les deux systèmes vasculaires (Kleier, 1988). Comme le débit xylémien est plus élevé que le débit phloémien, le xylème redistribue vers le haut des composés qui au départ sont exportés de la feuille par le phloème ascendant et descendant. Cela expliquerait la présence de résidus dans les fruits situés sous la feuille traitée même en l'absence de phloème actif. Une telle redistribution a été récemment mise en évidence pour le glufosinate chez l'ambrosie (Gauvrit et al, 2006).

Ainsi, ces travaux montrent que bien que l'imidaclopride possède dans la plante, grâce à ses caractéristiques physico-chimiques, une distribution de type xylémienne. La distribution des résidus par le flux phloémien est d'égale importance pour la contamination du fruit. Les produits chimiques se déplaçant à la fois dans le xylème et le phloème sont appelés produits ambimobiles. Toutefois, dans le cas de l'imidaclopride, cette ambimobilité est très limitée et ne semble avoir d'importance que pour les fruits.

CHAPITRE IV

METABOLISME DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE

IV. METABOLISME DE L'IMIDACLOPRIDE CHEZ LA TOMATE

1. Introduction

Le métabolisme de l'imidaclopride a été examiné dans une large variété de plantes cultivées, pommes de terre, tomates, pommes, maïs, coton, en vue de l'autorisation de cette molécule. Koester (1992) a étudié le métabolisme comparé de l'imidaclopride dans des cultures de cellules en suspension de plusieurs espèces de plantes. Chez la tomate, en culture cellulaire, Koester (1992) n'a identifié que le dérivé oléfine. Cependant dans ces cultures, le métabolisme est faible avec seulement 3% de métabolisation. Après traitement foliaire, la demi-vie de l'imidaclopride dans les légumes et les oléagineux varie de trois à cinq jours (Araki, 1994). Il semble donc, au vu de cette demi-vie sur plante entière, que ce métabolisme pourrait être plus actif sur les plantes entières. Toutefois, le taux de métabolisation pouvant dépendre de la variété ou de la souche cellulaire utilisée, nous avons étudié la métabolisation de l'imidaclopride sur des cultures cellulaires de tomate. En effet, le métabolisme des xénobiotiques est généralement plus facile à étudier dans des cultures de cellules en suspension que dans les plantes entières. De plus, les cultures cellulaires sont généralement considérées comme des systèmes modèles (Harms, 1992 ; Menéndez, 1997). Dans la plupart des cas, les plantes et les cultures cellulaires métabolisent le composé de façon qualitativement similaire même si des différences quantitatives peuvent exister (Komoßa, 1995). Les cultures cellulaires offrent plusieurs avantages, elles sont stériles et leur métabolisme n'est donc pas influencé par les micro-organismes (Campeur, 1989 ; Bing, 1984). D'autre part, l'utilisation de cultures cellulaires évite les difficultés de pénétration et de translocation rencontrées dans la plante entière (Haque, 1984). Le composé est ainsi absorbé et métabolisé plus rapidement que par les plantes intactes. L'assimilation uniforme par l'ensemble des cellules permet alors une interprétation des voies métaboliques plus aisée (Mumma et Hamilton, 1983 ; Schuphan et Haque, 1984). Grâce aux taux métaboliques souvent plus élevés, à l'exception des résultats de Koester (1992), les cultures cellulaires ont été utilisées tant pour des études de métabolisme des pesticides qu'en tant qu'outils de production rapide de métabolites (Schmidt, 1997 ; Mumma, 1979), les métabolites étant généralement plus faciles à isoler que dans le végétal entier (Edouard, 1982).

Nous avons aussi analysé les résidus d'imidaclopride dans les feuilles et les fruits de tomate afin de déterminer la nature des différents composés présents dans les différents organes de la plante de tomate.

Cela permettra d'une part de déterminer si les résidus formés sont identiques dans le cas des deux traitements, sol ou foliaire. D'autre part, certains de ces métabolites peuvent être biologiquement actifs (Suchail, 2001) et agissent de concert avec l'insecticide parent. Ils fournissent ainsi un contrôle efficace et durable de la récolte (Nauen et Tietjen, 1998). Araki (1994) a montré que certains métabolites développent un pouvoir insecticide contre différentes espèces de pucerons. Particulièrement, l'oléfine est au moins 10 fois plus active que l'imidaclopride et peut influencer l'activité insecticide résiduelle dans des plantes traitées par l'imidaclopride, malgré sa concentration relativement basse (Nauen, 1998 ; Westwood, 1998 ; Araki, 1994 ; Koester, 1992). Certains autres, tels que le résidu dénitro-imidaclopride peut être plus toxique pour les animaux que l'imidaclopride. De plus, les propriétés physico-chimiques des métabolites ont été établies et comparées avec celles de l'imidaclopride. Les valeurs de log Kow sont plus faibles pour tous les métabolites examinés. En particulier, l'oléfine est le seul composé avec un proton acide ($pK_a = 7,2$) dans des conditions de pH physiologique, suggérant qu'il puisse être plus mobile dans le phloème (Bromilow et Chamberlain, 1991). Ainsi l'analyse des résidus dans les différents compartiments de la plante devrait permettre de déterminer quels sont les résidus qui sont mobiles dans le végétal, particulièrement ceux qui sont transloqués dans le phloème.

2. Matériel et méthodes

2.1. Culture cellulaire

2.1.1. Conditions de culture

Les cellules de tomate ont été fournies par le laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Fruits (ENSA, Toulouse). Elles sont cultivées dans des erlenmeyers de 1 L contenant 250 ml de milieu de culture (cf Annexe). Elles sont maintenues à 26 °C à la lumière, avec une agitation permanente de 175 rotations par minute. Elles sont repiquées tous les sept jours par transfert de 25 ml de suspension cellulaire dans 250 ml de milieu de culture frais.

2.1.2. Métabolisme cellulaire

Des cellules de tomate (250 ml) âgées de 13 jours ont été contaminées par une solution de 10 mg de [^{14}C] imidaclopride (activité spécifique 2,5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$). Après homogénéisation, les cellules ont été réparties dans des erlenmeyers de 50 ml contenant 20 ml de cellules contaminées et incubées sous agitation de 24 à 168 h (3 répétitions pour chaque temps).

Après l'incubation, les cellules ont été séparées du milieu de culture par filtration sur filtre Whatman GF/B. La galette de filtration a été rincée deux fois à l'eau distillée puis les cellules ont été reprises avec un mélange d'acétonitrile et d'eau (4:1, v/v) et gardées une nuit à 4 °C. Les cellules ont ensuite été homogénéisées par ultrasons à l'aide d'un sonicateur et centrifugées à 3 000 g pendant 10 min à 4 °C. Le culot a été lavé deux fois avec le même mélange de solvants. Le surnageant et les solutions de rinçage ont été combinés et contiennent les résidus extractibles ou solubles. Après détermination de la radioactivité, les extraits ont été séchés au speed-vac avant d'être injectés en CLHP.

Les culots d'extraction, contenant les résidus non extractibles, ont été séchés à l'air libre pendant 48 h pour éliminer le solvant organique, et lyophilisés 48 h pour éliminer l'eau et ont ensuite été brûlés à l'oxidizer pour déterminer la radioactivité incorporée dans les résidus pariétaux (résidus inextractibles).

2.2. Métabolisme dans les fruits ex vivo

Des fruits de tomate de la variété Montfavet 63-sf ont été récoltés à différents stades de maturité, estimée en fonction de la couleur des fruits : vert, orange ou rouge. Ces fruits ont été trempés 5 min dans l'eau de Javel à 10% pour stériliser leur surface puis rincés plusieurs fois avec de l'eau stérile. Des tranches fines d'environ 1 mm d'épaisseur ont été prélevées sur ces fruits. Puis, environ 1 g de tranches ont été incubées dans des boîtes de pétri pendant un ou trois jours (3 répétitions). Chaque boîte contenait 1 g de tranches de tomate, 10 ml de la solution nutritive stérile (solution de Hoagland, 1/10^e), 0,83 μl de Confidor[®] et 0,5 μCi de [^{14}C] imidaclopride. Les échantillons ont été incubés dans une armoire climatisée avec une alternance jour nuit de 16 h et une température de 23 C° le jour et de 19 C° la nuit. A chaque temps, les tranches ont été retirées du milieu nutritif, rincées avec de l'eau et broyées dans un mortier à l'aide d'azote liquide. Le broyat a été repris par 4 ml de solvant (acétonitrile/eau, 4:1, v/v).

Les échantillons ont été laissés une nuit au réfrigérateur puis homogénéisés 10 min par ultrasons à l'aide d'un sonicateur Branson (sonifier 450, Fisher Bioblock, Illkirch, France) et centrifugés 10 min à 10 000g. Le culot a été lavé deux fois par la solution d'extraction puis les trois extraits ont été rassemblés et séchés avant d'être repris dans une solution acétonitrile/eau (1:1, v/v) pour être injectés en CLHP.

2.3. Préparation des extraits de plantes

Les tissus des plantes lyophilisées et broyées ont été extraits avec un mélange d'acétonitrile et d'eau (4:1, v/v), 4 ml.g⁻¹ de tissu sec. Puis, chaque échantillon a été homogénéisé pendant 2 min avec un vortex et stocké une nuit à -20 °C. Le broyat a été ensuite homogénéisé par ultrasons à l'aide d'un sonicateur Branson et centrifugé à 10 000 g pendant 10 min à 4° C. Le culot a été lavé deux fois avec le même mélange de solvants et les trois surnageants ont été combinés. Ils contiennent les résidus extractibles ou solubles. La phase organique a été évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température inférieure à 35 °C. La phase aqueuse restante a ensuite été purifiée sur une cartouche d'extraction en phase solide (SPE). Les culots d'extraction, contenant les résidus non extractibles, ont été séchés à l'air libre pendant 48 h pour éliminer le solvant organique et lyophilisés 48 h pour éliminer l'eau. Ils ont ensuite été brûlés à l'aide d'un oxidizer.

2.4. Purification sur une cartouche SPE (Extraction en Phase Solide)

Avant de déposer l'échantillon, la cartouche (Supelclean LC-18, Supelco, France) a été activée par un volume de colonne de méthanol puis rincée avec de l'eau permutée. L'extrait des résidus solubles a été déposé sur la cartouche activée puis la cartouche a été lavée avec de l'eau et éluée par un mélange acétonitrile/eau (4:1, v/v). Une aliquote de chaque fraction a été prélevée pour déterminer la radioactivité. Après mesure de la radioactivité, les fractions contenant de la radioactivité ont été séchées à l'aide d'un speed-vac puis les échantillons repris avec le mélange acétonitrile/eau (1:1 v/v) afin d'être analysés en CLHP.

2.5. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Les résidus ont été analysés par chromatographie liquide haute performance sur une chaîne Spectra-Physics P4000 (Les Ulis, France) comprenant un détecteur UV P1000 réglé à 270 nm. La séparation des métabolites a été effectuée à l'aide d'une colonne en silice greffée d'une chaîne octadécyle C18 Bischoff (Prontosil Eurobond, 250 x 4,6 mm, 5,0 μ M) couplée à une précolonne de 1 cm (C18, Ultrasep, ICS).

L'élution a été réalisée à 30 °C à un débit de 1 ml min⁻¹. En sortie de colonne, la radioactivité a été suivie avec un détecteur de radioactivité en continu Flo-One β A250 (Packard, volume de la cellule: 0,5 ml; 2 ml de liquide scintillant Flo-Scint II, Perkin Elmer life Sciences, pour 1 ml d'effluent CLHP). Les phases mobiles étaient composées du solvant A (eau/acétonitrile/acide acétique) (96:2:2, v/v/v) et du solvant B (eau/acétonitrile/acide acétique) (18:80:2, v/v/v).

La colonne a été équilibrée avec 100% de solvant A puis l'élution a été réalisée par un gradient en escalier : 0 min : 0% B ; de 20 à 30 min : 12% B ; de 40 à 50 min : 100% B.

L'analyse des chromatogrammes obtenus a été réalisée par comparaison des temps d'élution des pics avec des métabolites standards décrits dans la littérature (Koester, 1992). Les standards analytiques ont été fournis par la société Bayer (France). Dans nos conditions analytiques, les temps de rétention des métabolites sont : urée, 31 min ; 4- ou 5-hydroxy-imidaclopride, 27 min ; oléfine, 24 min ; guanidine, 13,1 min. L'imidaclopride est élué à 36 min.

Quand cela a été possible, la structure des molécules a été confirmée par spectrométrie de masse. Pour cela, la chaîne CLHP est couplée à un collecteur de fractions (Gilson modèle 201/202, Gilson France, Villiers Le Bel, France). Les tubes des solvants contenant de la radioactivité ont été séchés au speed-vac et le résidu analysé par spectrométrie de masse (SM).

2.6. Spectrométrie de masse

L'identification structurale des métabolites a été réalisée sur un spectromètre de masse de type piège ionique quadripolaire (Finnigan LCQ, Thermo Finnigan, Les Ulis, France) équipé d'une source d'ionisation par electrospray opérant en mode positif.

Les échantillons (1 ng μ l⁻¹ dans MeOH-H₂O (50:50, v/v)) ont été introduits dans la source d'ionisation à un débit de 5 μ l min⁻¹. Le capillaire de transfert chauffé était maintenu à une température de 200 °C.

Les autres paramètres expérimentaux concernant la production et la transmission des ions produits par electrospray vers l'analyseur (voltage aiguille, début de gaz de nébulisation, voltage du capillaire de transfert, offset du tube lens) ont été ajustés pour chaque composé analysé de façon à obtenir la sensibilité maximale. Tous les autres paramètres liés aux expériences MS/MS (largeur de la fenêtre d'isolement des ions, voltage et temps d'excitation) ont également été ajustés pour obtenir une information structurale maximale pour le composé d'intérêt. Toutes les analyses ont été réalisées en mode contrôle de gain automatique en utilisant l'hélium comme gaz de collision pour la MS/MS.

3. Résultats

3.1. Métabolisme cellulaire

La pénétration de l'imidaclopride dans les cellules est faible. Une saturation de la pénétration de l'imidaclopride est atteinte entre 24 et 72 h, avec seulement environ 11% de l'imidaclopride à l'intérieur des cellules. Cela représente avec les métabolites en plus au maximum 16,5% de la radioactivité totale. Les métabolites représentent environ un tiers de l'imidaclopride qui pénètre dans les cellules.

Tableau IV-1 : Compartimentation métabolique de la culture.

		Temps de culture, heures			
		24	72	120	168
Imidaclopride	Quantité totale d'imidaclopride dans les cellules, μg^*	$26,7 \pm 0,8$	$86,9 \pm 5,80$	$126,6 \pm 23,5$	$135,4 \pm 12,3$
	ratio cellules/culture** %	1,80	10,88	10,12	11,20
Métabolites	Solubles *** %	42,17	25,42	25,14	32,95
	Résidus liés*** %	$2,84 \pm 1,23$	$2,18 \pm 0,55$	$2,05 \pm 0,70$	$2,51 \pm 0,59$

* μg calculé en équivalent d'imidaclopride ;

** pourcentage d'imidaclopride cellulaire par rapport au total dans la culture ;

*** pourcentage de métabolites ou de résidus liés dans les cellules.

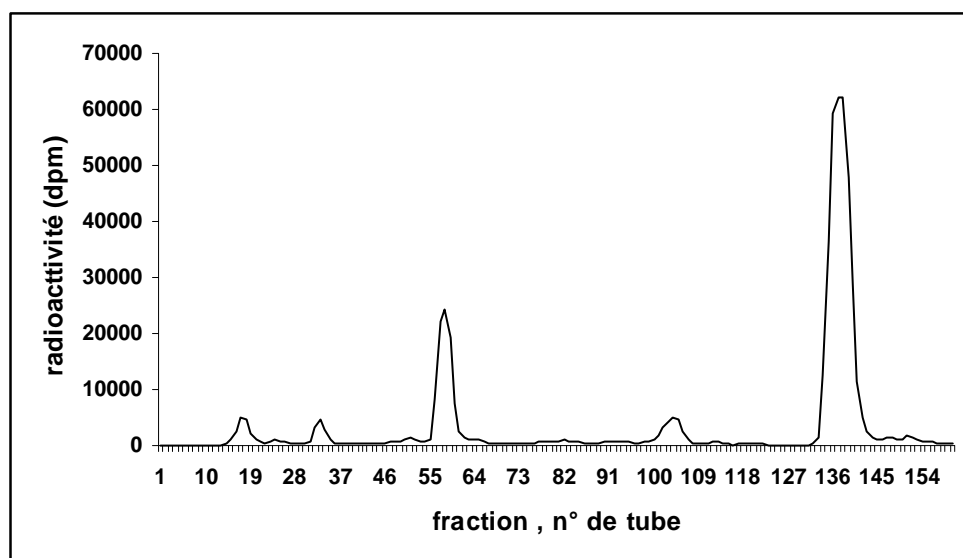


Figure IV-1. Radiochromatogramme obtenu par collecte après élution par CLHP d'un extrait de cellules de tomate incubées 168 h avec le [^{14}C] imidaclopride, 4 tubes = 1 min.

Les analyses en CLHP (Figure IV-1) des extraits bruts des cellules montrent, quel que soit le temps, l'apparition de 5 pics en plus de celui correspondant à l'imidaclopride (Rt 36 min) (Figure IV-2).

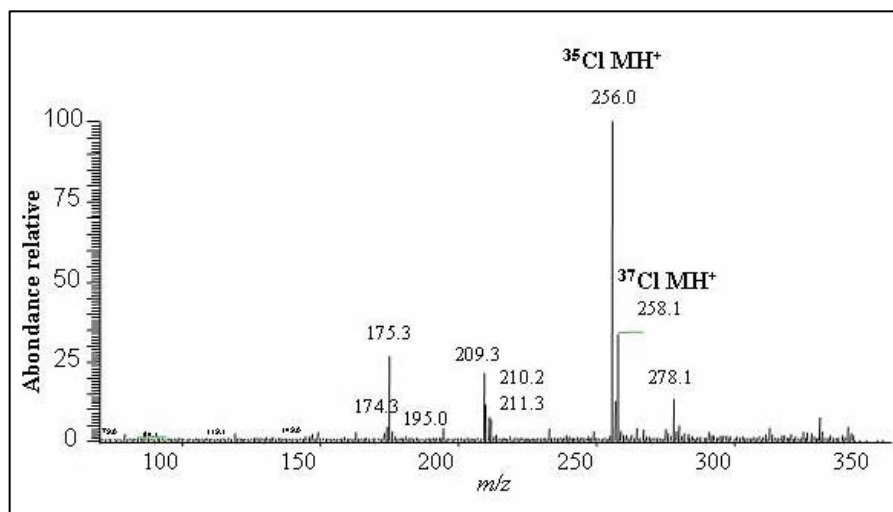


Figure IV-2. Spectre de masse de l'imidaclopride.

A chaque temps, les mêmes pics sont présents et la quantité de chaque métabolite augmente avec le temps.

La comparaison du temps de rétention du pic 4 avec celui de standards et l'analyse en spectrométrie de masse (Figure IV-3) a permis d'identifier sous ce pic deux composés, le dénitro-imidaclopride (guanidine) (Figure IV-3.a) et le dérivé dénitro-oléfine (Figure IV-3.b). Sur la base d'une comparaison avec les standards, le pic 5 a été identifié comme le dérivé oléfine (Figure IV-4). Les deux premiers pics n'ont pu être reliés à un métabolite connu, leur faible taux n'ayant pas permis leur identification.

Le pic 3, malgré sa plus faible concentration, a toutefois pu subir une analyse en spectrométrie de masse (Figure IV-5.a). La masse de l'ion moléculaire de ce métabolite possède un cluster de pics de m/z 268/270 caractéristique d'une molécule mono-chlorée. Le spectre SM² de l'ion moléculaire m/z 268 possédant un ³⁵Cl (Figure IV-5.b) montre la production des ions fragments m/z 240, 232, 194 indiquant la perte probable des fragments -CO, -H³⁵Cl et - (CH₂=N-NO₂). L'analyse de l'ion parent possédant l'isotope ³⁷Cl m/z 270 confirme cette fragmentation avec l'obtention des pics m/z 242 (perte de -CO) et 196 (perte de -(CH₂=N-NO₂)). L'obtention du pic m/z 232 correspond à la perte du fragment -H³⁷Cl. Le spectre SM³ des ions fils m/z 240 ou 242 conduit à la production dans les deux cas des ions m/z 114 et 204 correspondant respectivement à la perte du fragment méthylène-chloronicotinique et de HCl avec leur isotope chloré respectif ³⁵Cl ou ³⁷Cl. La perte du fragment m/z correspond à la perte d'un carbone oxydé. Ce métabolite peut donc être identifié comme un dérivé oxydé sur le cycle imidazolidine de l'imidaclopride. Toutefois, le poids moléculaire des ions parents m/z 268/270 montre par rapport à une molécule d'imidaclopride oxydée, la perte supplémentaire de 2 unités de masse. Cela correspond à la présence, en plus de l'oxygène, d'une double liaison sur le cycle imidazolidine, probablement entre l'azote 3 et le carbone 4. Cette molécule peut être donnée comme étant le 3,4-déhydro-5-oxo-imidaclopride.

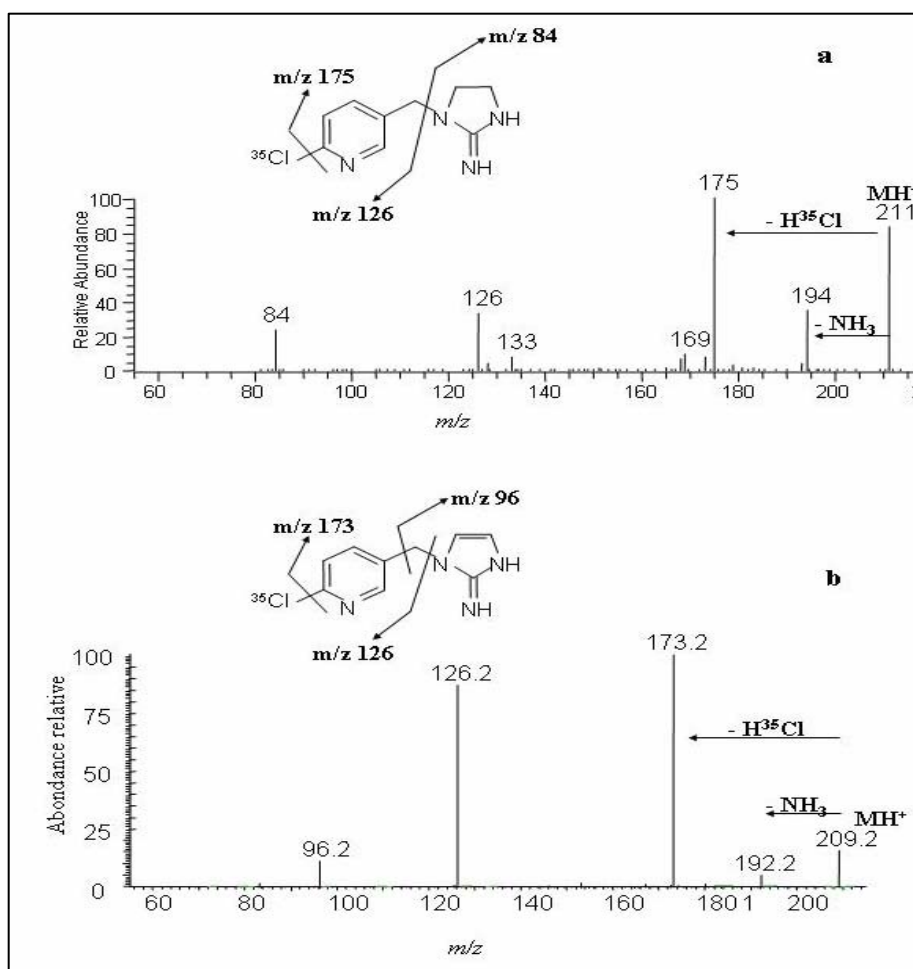


Figure IV-3. Spectres de masse (SM^2) des ions moléculaires ^{35}Cl des 2 métabolites détectés sous le pic 4 : **a.** dénitro-imidaclopride ou guanidine ; **b.** dénitro-oléfine.

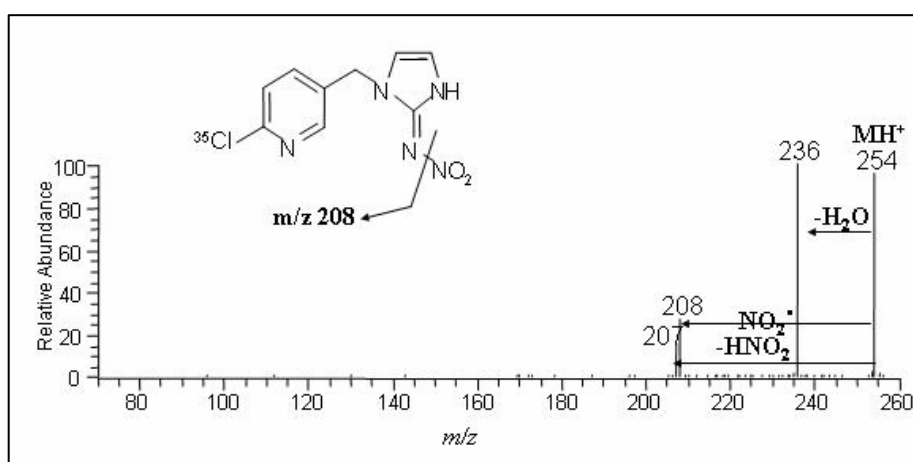


Figure IV-4. Spectre de masse (SM^2) de l'ion moléculaire m/z 254 du métabolite détecté sous le pic 5 : oléfine.

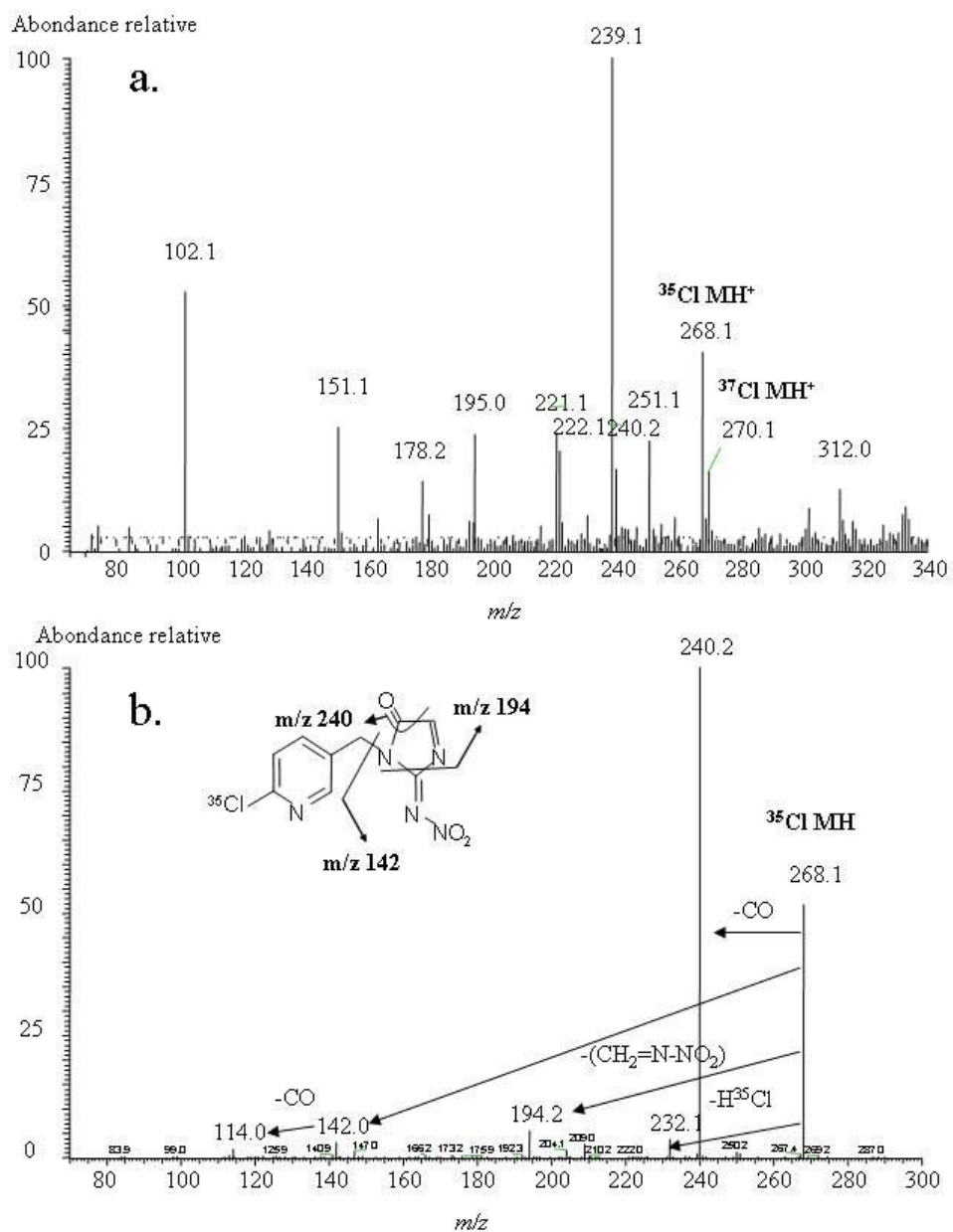


Figure IV-5. Spectres de masse du composé détecté sous le pic 3 dans les extraits cellulaires.

a. SM des ions moléculaires

b. SM² de l'ion moléculaire m/z 268 avec en cartouche la fragmentation de l'ion.

3.2 Métabolisme dans la plante entière

3.2.1. Après le traitement du sol

L'extraction des résidus a été réalisée sur les plantes standard provenant des expérimentations précédentes. Les broyats des feuilles de tomate âgées de 30, 45, 60 et 75 jours, des fruits et des racines à 60 jours après la contamination du sol ont été extraits et analysés en CLHP.

Dans les profils CLHP obtenus à partir d'extrait brut, nous avons pu observer des métabolites dans toutes les feuilles, toutefois dans des proportions variables. Les feuilles les plus âgées, situées en bas des plantes et qui sont donc exposées plus longtemps à la molécule, ont métabolisé la molécule parent en quantité plus importante que les feuilles les plus jeunes.

Ainsi, la majorité (65%) de la radioactivité retrouvée dans la feuille numéro 3 sur une plante de la série standard âgée de 30 jours est constituée par des métabolites et 35% par la molécule parent. Sur le radiochromatogramme (Figure IV-6.a), trois métabolites sont observés (Rt 3,1 min, 6% ; Rt 13,3 min, 44% ; Rt 24 min, 15% ; imidaclopride Rt 36,6 min).

Dans la feuille numéro 6 (Figure IV-6.b) de la même plante, plus jeune, la proportion des métabolites (51%) est inférieure à celle détectée dans les feuilles plus âgées, feuille numéro 3 notamment. Un quatrième métabolite, Rt 27-28 min est suspecté.

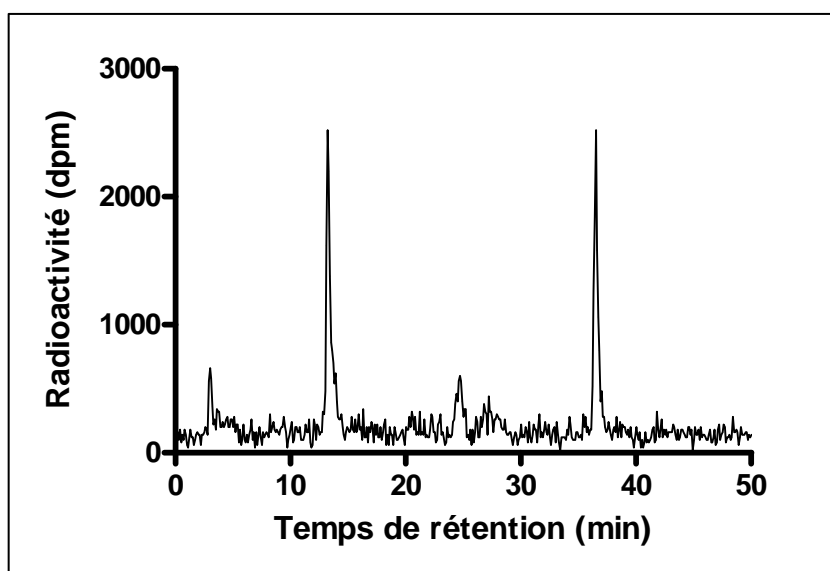


Figure IV-6.a. Métabolisme de l'imidaclopride dans la feuille numéro 3 d'une plante de tomate après 30 jours de contamination du sol.

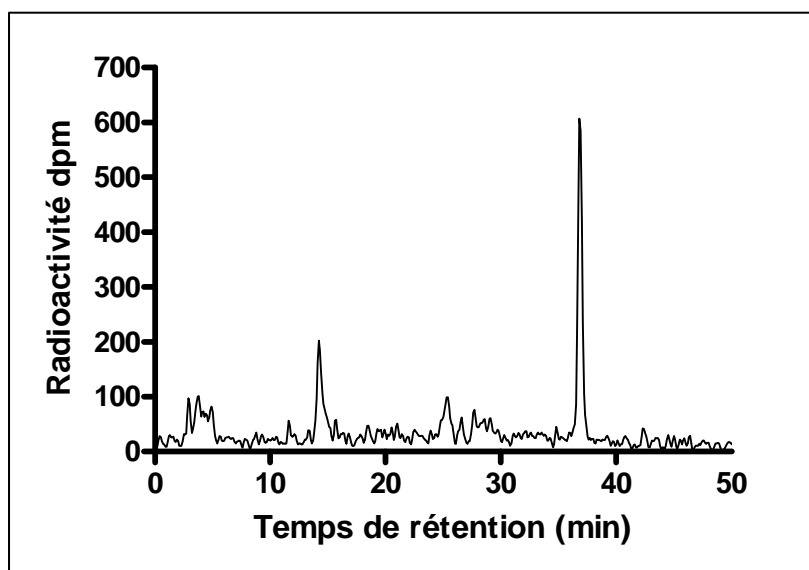


Figure IV-6.b. Métabolisme de l'imidaclopride dans la feuille numéro 6 d'une plante de tomate après 30 jours de contamination du sol.

Le métabolisme augmente au cours du temps. En effet, la proportion des métabolites augmente dans la feuille numéro 3 sur une plante âgée de 45 jours, 70% de la radioactivité détectée sont constituées par des métabolites ; les trois premiers métabolites sont également détectés.

A 60 jours, la proportion des résidus dans la feuille numéro 3 est la même (70% de métabolites). Par contre, dans la feuille numéro 14 sur la même plante (Figure IV-7), la majorité de la radioactivité reste constituée par l'imidaclopride (60%) et un seul métabolite très polaire a été détecté, Rt 3,1 min. Dans les racines à 60 jours, la proportion de résidus solubles n'est que de 80%, 20% étant sous forme liée. Le radiochromatogramme (Figure IV-8) obtenu à partir d'un extrait aqueux de racines montre que le composé principal est l'imidaclopride. Des traces des autres métabolites déjà retrouvés dans les autres parties de la plante sont détectés (Rt 3,1 - 13,3 - 24,8 - 27,9 min) dont la guanidine et l'oléfine. Par contre un métabolite plus apolaire (Rt: 37,9 min) que l'imidaclopride a été détecté mais n'a pu encore être identifié. Dans les fruits de tomate, 60 jours après la transplantation sur sol contaminé, la grande majorité des résidus (90%) retrouvés sont des résidus solubles. Dans les radiochromatogrammes obtenus à partir d'extraits bruts (non pré-purifiés par SPE), deux pics ont été détectés, l'imidaclopride (77%, Rt 36,2 min) et un pic plus polaire (Rt 3,1 min, 23%) (Figure IV-9).

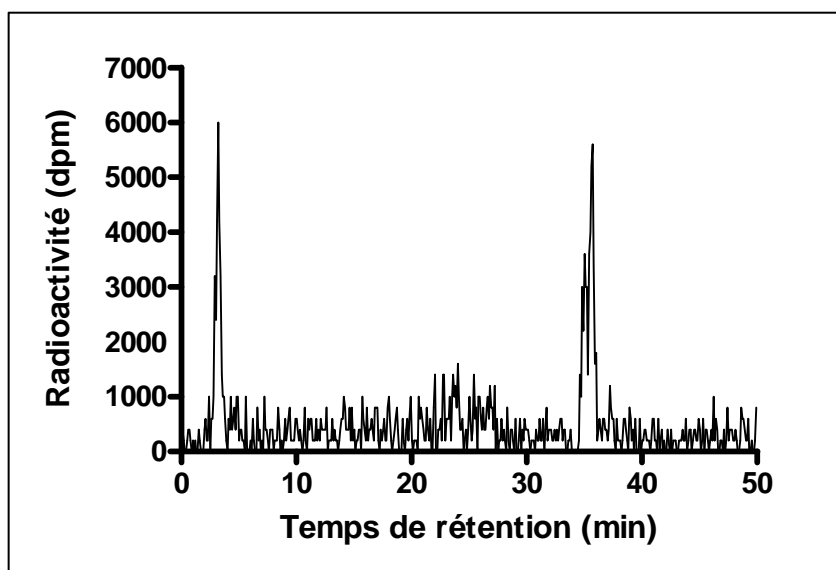


Figure IV-7. Métabolisme de l'imidaclopride dans la feuille numéro 14 d'une plante de tomate après 60 jours de contamination du sol.

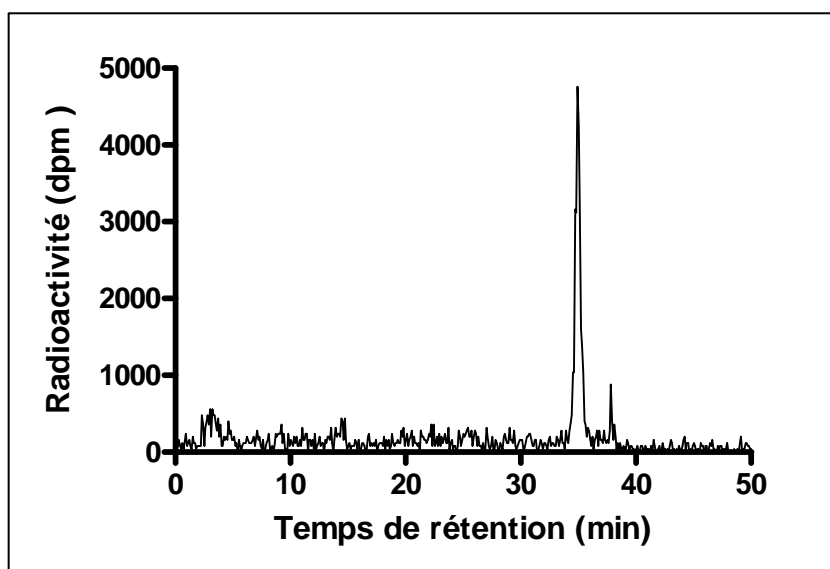


Figure IV-8. Métabolisme de l'imidaclopride dans les racines de tomate après 60 jours de contamination du sol.

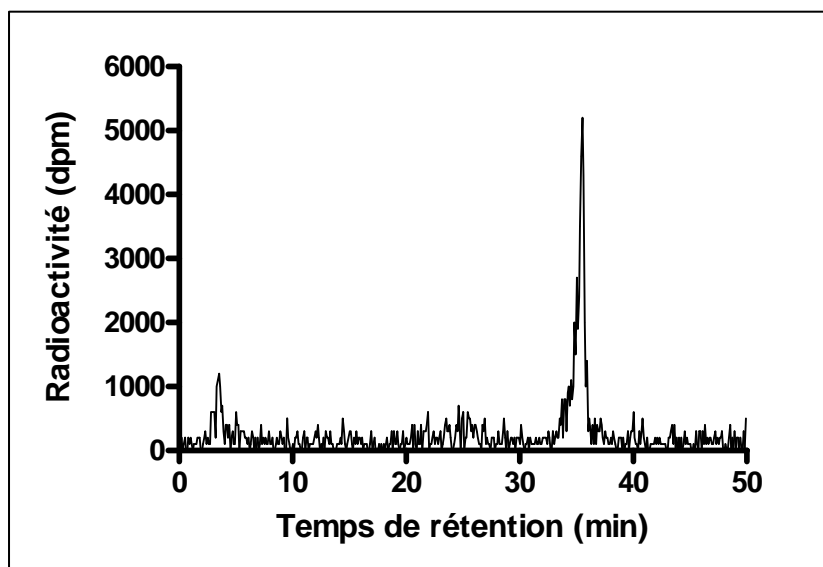


Figure IV-9. Métabolisme de l'imidaclopride dans les fruits de tomate après 60 jours de contamination du sol.

3.2.2. Après le traitement foliaire

L'extraction des résidus a été réalisée comme précédemment sur les broyats résiduels des feuilles traitées, des feuilles non traitées, des fruits et des racines des plantes de tomate ayant reçu un traitement foliaire.

Dix jours après le traitement foliaire, les feuilles métabolisent l'imidaclopride beaucoup plus rapidement qu'après le traitement du sol. Sur les chromatogrammes obtenus en CLHP à partir des extraits bruts des feuilles traitées soit 7 jours seulement après le traitement, une dizaine de pics sont détectés en plus de l'imidaclopride et ce dernier ne représente qu'environ 20% du total des résidus (Figure IV-10). Dans ces feuilles, la moitié des métabolites est constituée par des composés dénitro.

Par contre, dans les extraits des feuilles situées au-dessus des trois feuilles traitées (Figure IV-11), l'imidaclopride est majoritaire et représente environ 70% des résidus. Le reste est constitué de trois pics de quantité à peu près égale, la « guanidine », le 2^{ème} pic polaire à 26,9 min et un massif de pics moins polaires que l'imidaclopride entre 37 et 42 min.

Dans les extraits bruts des feuilles situées sous les feuilles traitées (Figure IV-12), c'est-à-dire sous le premier bouquet floral, l'imidaclopride n'a pas été détecté et plus de 75% de la radioactivité sont dus à un seul pic (Rt 26,9 min), déjà détecté dans les feuilles supérieures. Le reste est réparti en plusieurs massifs de pics non résolus.

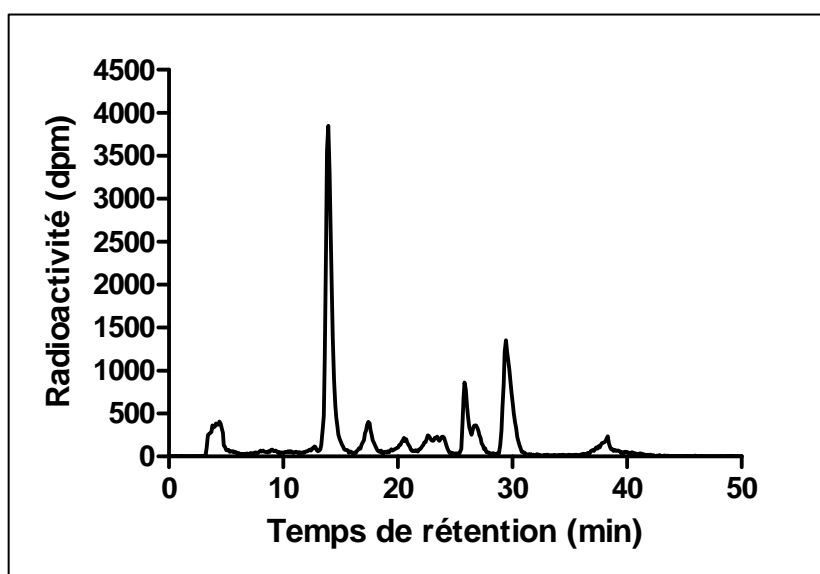


Figure IV-10. Métabolisme de l'imidaclopride dans les feuilles traitées.

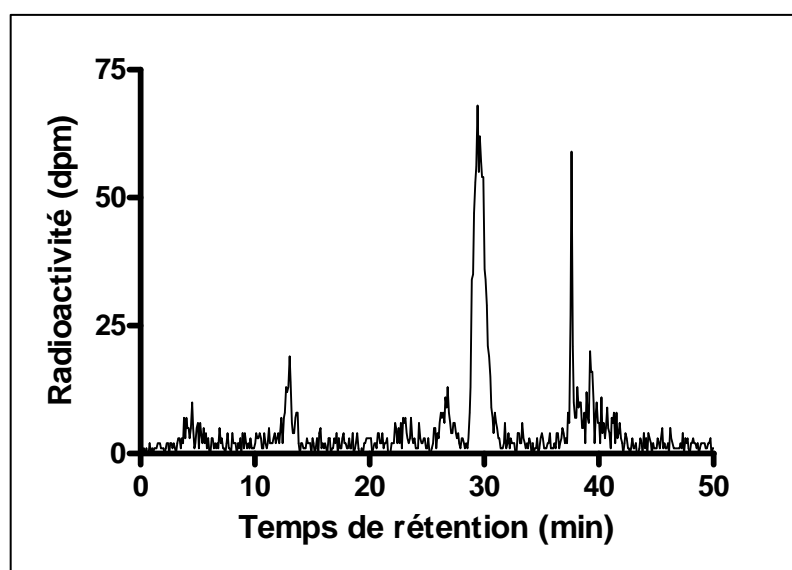


Figure IV-11. Métabolisme de l'imidaclopride dans les feuilles situées en haut de la 1^{ère} inflorescence (feuilles hautes de la plante) après le traitement foliaire.

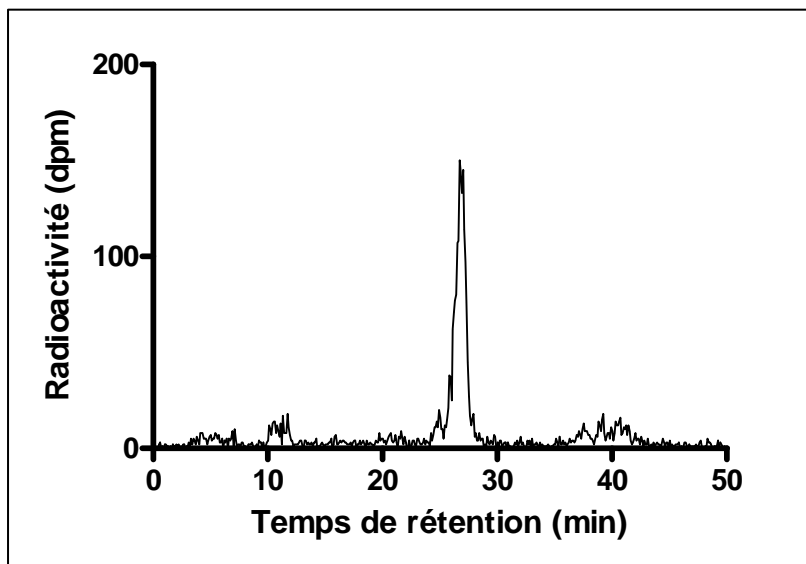


Figure IV-12. Métabolisme de l'imidaclopride dans des feuilles situées en bas de la 1^{ère} inflorescence (feuilles basses de la plante) après le traitement foliaire.

Dans les racines (Figure IV-13), comme précédemment, l'imidaclopride n'est pas détecté et deux pics ont été mis en évidence sans que l'on puisse formellement les identifier.

Dans les fruits, seul le pic le plus polaire (Rt 3,10 min) est détecté, sans présence détectable d'imidaclopride mais les teneurs sont trop faibles pour être analysées de manière fiable.

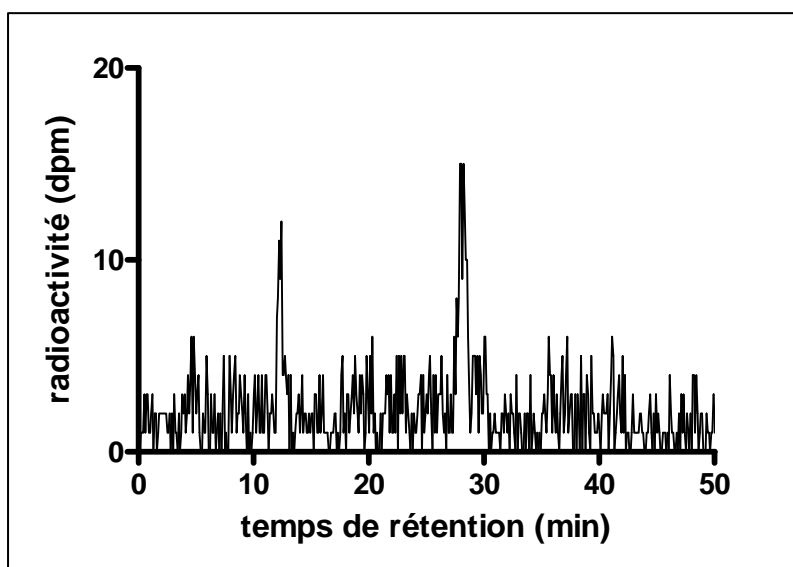


Figure IV-13. Métabolisme de l'imidaclopride dans les racines de plante de tomate après le traitement foliaire.

3.2.3. Remobilisation

L'extraction des résidus a été réalisée sur les broyats des racines et des feuilles de tomate préexistant lors du traitement (neuf premières feuilles de la plante), ainsi que sur des feuilles et des fruits apparus après le traitement. L'objectif était de déterminer quels sont les métabolites transférés dans ces parties.

Sur les radiochromatogrammes des extraits bruts de racines, on observe la présence de deux pics, un pic à 3,10 min et la guanidine, représentant respectivement 30% et 70% de la radioactivité. L'imidaclopride n'a pas été détecté.

Par contre, dans les extraits des neuf premières feuilles, trois pics sont détectés sur les radiochromatogrammes. En plus de l'imidaclopride, qui ne représente que 13% de la radioactivité, trois pics sont observés : un pic à 3,10 min (11,3%), la guanidine qui est majoritaire (63%) et un pic à 30,0 min (7%).

En revanche, dans les profils CLHP obtenus à partir d'extraits bruts de feuilles apparues après le traitement, nous n'avons observé que le métabolite polaire et la guanidine. Dans les fruits, seul un pic polaire à 3,1 min est détecté. Dans les fruits comme dans les feuilles nouvelles, le faible taux de résidus ne permet pas une analyse correcte des radiochromatogrammes.

3.3. Métabolisme dans les fruits ex vivo

Dans l'expérimentation sur plante entière, un métabolite a été détecté dans les extraits de fruits. Afin de déterminer l'origine de ce métabolite et la capacité des fruits à métaboliser par eux-mêmes l'imidaclopride, nous avons réalisé une expérimentation sur des fruits ex vivo contaminés par l'imidaclopride.

A tous les temps et quel que soit le degré de maturité des tomates, l'imidaclopride est métabolisé mais le résultat dépend de la maturité des fruits. Pour les tranches de tomates vertes après 96 h d'incubation (Figure IV-14.a), les métabolites représentent entre 20 et 50% de la radioactivité incorporée dans les tranches. Deux pics principaux sont observés dans les différents chromatogrammes. Le premier à 17,3 min et le second à 24,7 min correspondant dans les conditions analytiques utilisés ici aux dérivés dénitro-imidaclopride et à l'oléfine. Les composés dénitro peuvent représenter jusqu'à 80% des métabolites.

Dans les tranches des tomates mures (tomates rouges) et de maturité intermédiaire (tomates orange), (Figure IV-14.b) la métabolisation est comparable mais le métabolisme semble un peu moins actif que dans les fruits verts. Seulement, environ 30 et 10% d'imidaclopride sont métabolisés à 96 h dans les tomates orange et rouge, respectivement. Là aussi, le pic correspondant aux dénitro-imidaclopride est majoritaire.

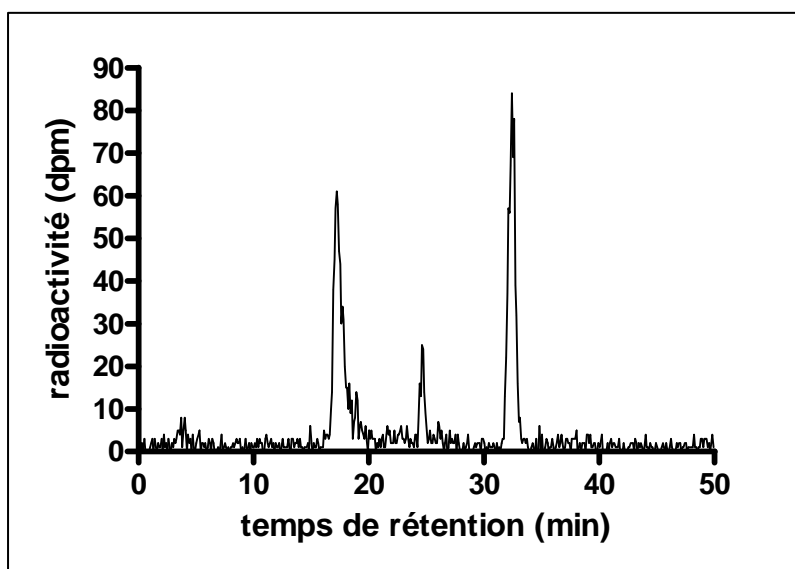


Figure IV-14.a. Métabolisme de l'imidaclopride dans des tranches de fruits verts de tomate.

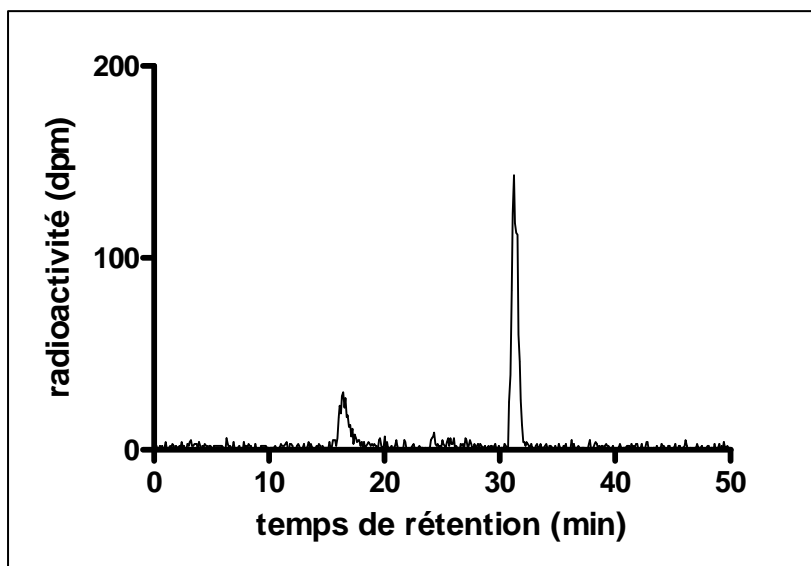


Figure IV-14.b. Métabolisme de l'imidaclopride dans des tranches de fruits orange de tomate.

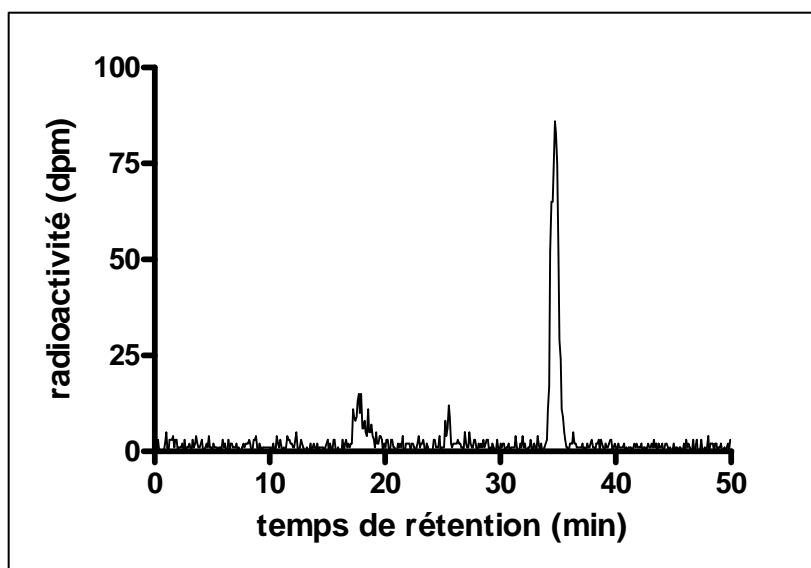


Figure IV-14.c. Métabolisme de l'imidaclopride dans des tranches de fruits rouges de tomate.

4. Discussion

Dans ces expérimentations, le but était d'identifier la nature des métabolites présents dans les plantes de tomates et particulièrement dans les fruits. L'utilisation de cultures cellulaires de tomate devait aider à résoudre les difficultés analytiques rencontrées habituellement lors d'analyses effectuées sur des organes entiers. Malgré une activité métabolique de nos cultures cellulaires supérieure à ce qui avait précédemment été décrit dans la littérature (Koester, 1992), ce but n'a été que partiellement atteint, probablement car l'activité cellulaire encore trop faible aurait nécessité une accumulation plus importante de ces dérivés. Cependant, quatre métabolites ont pu être identifiés, l'oléfine, les deux dérivés dénitro, dénitro-imidaclopride et dénitro-oléfine, et le dérivé 3,4-déhydro-5-oxo-imidaclopride. Le premier est en accord avec les résultats de Koester (1992). Les deux dérivés dénitro ont déjà été détectés dans d'autres plantes. Par contre, nous avons identifié pour la première fois un métabolite, le 3,4-déhydro-5-oxo-imidaclopride, qui n'a été détecté dans aucune source.

Nous supposons que ce métabolite provient de la déshydratation du 5-hydroxy-imidaclopride (Figure IV-15). Toutefois, la réelle provenance métabolique de ce composé, bien que nos échantillons aient été conservés dans de bonnes conditions avant l'analyse, doit être confirmée.

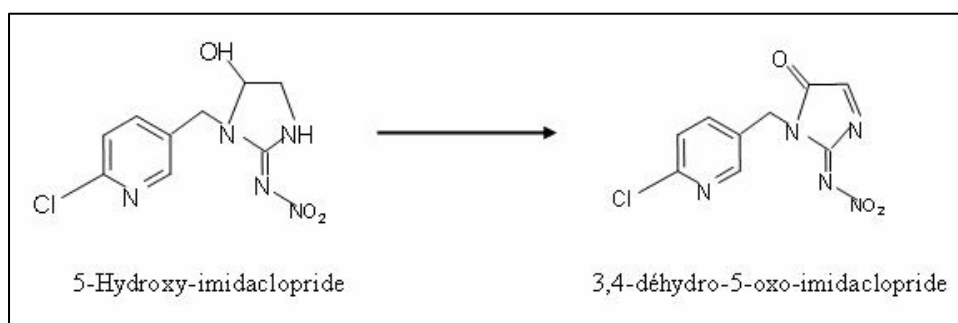


Figure IV-15. La déshydratation du 5-hydroxy-imidaclopride.

La principale difficulté rencontrée lors de l'analyse des fruits et des feuilles est également la purification des métabolites très polaires. En cela l'utilisation des cellules n'a malheureusement pas pu pallier aux difficultés des manipulations « in vivo » comme c'est habituellement le cas, le métabolisme in vivo semblant dans ce cas plus approprié que le métabolisme « in vitro ». Toutefois, ces cultures ont confirmé l'importance de deux métabolites et peut-être de trois : le métabolite le plus polaire et la guanidine. Le premier est systématiquement retrouvé dans tous les échantillons et il est même le seul métabolite présent dans les fruits in vivo. L'importance du composé polaire nécessitera une étude plus poussée pour essayer de déterminer la ou les structures des métabolites que ce pic recouvre. En effet, ce pic, comme nous avons pu le montrer sur un système de chromatographie différent en utilisant une colonne polaire, s'est dédoublé en plusieurs composés, sans toutefois permettre une purification suffisante. La multiplicité des produits détectés laisse penser qu'il s'agit probablement de métabolites conjugués à des sucres. En termes de surveillance sanitaire chimique, il est déterminant d'identifier le ou les aglycones de ces métabolites car ces dérivés glucosylés sont susceptibles d'être hydrolysés dans le tractus digestif des consommateurs.

Un autre facteur important va dans le sens d'une identification de ces résidus polaires. Ces derniers pourraient ne pas être des métabolites de l'imidaclopride mais être des faux résidus résultant de l'incorporation de [^{14}C] CO_2 dans les composés cellulaires endogènes. En effet, dans les essais sur plantes entières en conditions standards, nous avons mis en évidence une diminution de la teneur en radioactivité dans la plante. Cette diminution ne semble pouvoir être expliquée que par une perte de CO_2 radioactif hors de la plante. Or, parmi les métabolites retrouvés dans tous les échantillons, excepté les fruits, le dérivé guanidine est retrouvé.

Ce composé dénitroifié, aussi appelé dénitro-imidaclopride, peut être métabolisé par ouverture du cycle imidazolidine, en résidu chloronicotinique portant une chaîne latérale guanidinique linéaire, ouverte (Figure IV-16).

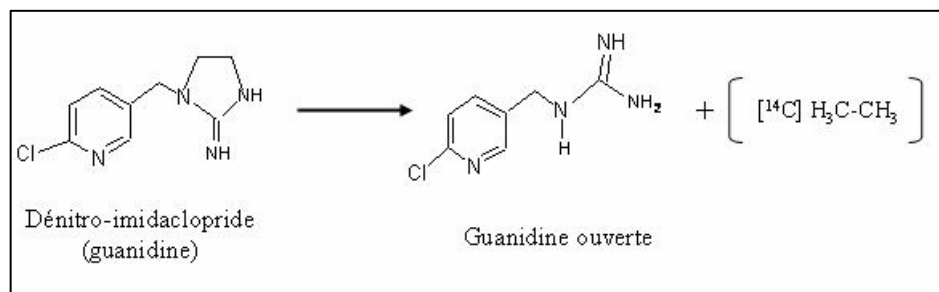


Figure IV-16. Ouverture du cycle imidazolidine de la guanine en résidu chloronicotinique portant une chaîne latérale guanidinique ouverte et perte des carbones 4 et 5.

Cette ouverture entraîne la perte des carbones 4 et 5 qui sont les carbones radiomarqués dans la molécule d'imidaclopride. Ainsi, la présence du métabolite guanidine expliquerait d'une part la diminution de la radioactivité totale dans la plante mais aussi la présence d'un faux résidu polaire.

Dans les cultures cellulaires et dans les incubations ex vivo de fruits, la structure des autres métabolites détectés, oléfine et hydroxy-imidaclopride demande à être confirmée. Cependant, ils ne représentent pas, de par leur faible taux dans les plantes entières et leur absence dans les fruits, un impact important sur le devenir de l'imidaclopride chez la tomate.

Enfin un dernier point doit être noté. Nous montrons dans les expérimentations de coupes de fruits contaminés par l'imidaclopride, que les fruits de tomates sont dotés de leur propre capacité à métaboliser l'imidaclopride. Ce n'est pas réellement surprenant au vu de la faible spécialisation métabolique des cellules végétales mais c'est une des premières démonstrations de cette capacité métabolique. Cette activité, toutefois, diminue en cours de maturation probablement en rapport avec les importantes modifications enzymatiques qui apparaissent à ce stade.

Cette étude décrit le métabolisme de l'imidaclopride dans les différents organes de la plante et la capacité de chacun d'eux à métaboliser cette molécule. Cependant, après un traitement foliaire localisé, le profil métabolique varie selon que les feuilles analysées sont situées au-dessus ou en-dessous du point de traitement.

Or, nous avons vu que toutes les feuilles avaient la même capacité métabolique puisque lors d'une contamination racinaire, le profil métabolique est quantitativement identique dans l'ensemble des feuilles. Les différences apparues nettement dans le cas de ce traitement foliaire semblent donc être dues plutôt à une différence de translocation des différents composés.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au début, le transfert de l'imidaclopride a été étudié selon trois protocoles différents de conduites culturales : plantes entières, taillées ou suppression de la source de contamination. Nos analyses montrent que l'imidaclopride, après avoir été absorbé par les racines, est rapidement transféré dans les parties aériennes où il se concentre dans les feuilles basses des plantes selon un gradient de concentration diminuant vers le haut du végétal. Les concentrations dans les feuilles dépendent essentiellement de la durée d'exposition des feuilles, de l'âge et de la position sur la plante, pour ce dernier paramètre en raison de la croissance selon un seul axe de la tomate. Cela est conforme à une distribution xylémienne du produit, en relation avec sa lipophilie, où le courant de transpiration est le moteur de sa circulation dans la plante. Par contre dans les fruits, les quantités seraient essentiellement dépendantes de la masse du fruit (la concentration est la même dans tous les fruits), et non de la position du bouquet floral sur la plante, alors que les deux organes sont alimentés par la même source d'imidaclopride. La croissance et l'expansion des fruits sont les conséquences de l'accumulation localisée d'eau et de matière sèche, l'eau représentant plus de 90% du poids total du fruit de tomate. La source principale d'eau pour la croissance des fruits de tomate est la sève phloémienne et non xylémienne car le fruit de tomate n'a pas une évapotranspiration importante.

Les plantes dont l'apex a été supprimé, ce qui limite le développement de la plante, montrent le même type de distribution de l'imidaclopride que les plantes non taillées, avec cependant des concentrations légèrement plus élevées. Ainsi, cette conduite culturale ne modifie pas sensiblement les paramètres cinétiques de la distribution et permettra l'utilisation de cette pratique culturale comme modèle dans les expérimentations suivantes.

Dans les plantes pour lesquelles le sol contaminé a été remplacé après un mois par un sol non contaminé, on a vu que des résidus de l'imidaclopride pouvaient être transférés des feuilles déjà contaminées vers les nouvelles feuilles selon un processus de remobilisation. Mais les taux remobilisés sont très faibles. Ces expérimentations montrent que l'imidaclopride peut contaminer les fruits à partir d'une contamination du sol, mais aussi qu'un transfert, même s'il reste très faible, peut se faire depuis les feuilles après une exposition temporaire des racines.

Cette remobilisation depuis les feuilles montre que l'imidaclopride ou certains de ces résidus peuvent sortir de la feuille par le courant phloémien (il n'existe pas de courant xylémien de sortie). Ce transfert phloémien est confirmé par le transfert de résidus, depuis des feuilles directement traitées à leur surface par l'imidaclopride, dans les deux sens du flux phloémien, c'est-à-dire dans le sens acropétale et le sens basipétale. En effet, des résidus de l'imidaclopride sont détectés dans les fruits et les feuilles qui sont situées en bas ou en haut des feuilles traitées.

La détermination de la structure des résidus dans les feuilles confirme aussi ce transfert phloémien. Lors d'une contamination du sol, toutes les feuilles présentent, au taux près, le même profil métabolique. Par contre, lorsque la contamination est faite sur quelques feuilles, un plus grand nombre de métabolites ont été détectés dans les feuilles traitées qu'après traitement racinaire. Mais aussi d'autre part, les profils des feuilles situées en-dessous de la zone traitée sont différents des profils des feuilles situés au-dessus. En particulier, l'imidaclopride n'est présent que dans les feuilles du dessus alors qu'un de ses métabolites, probablement l'oléfine, est retrouvé dans les feuilles du dessus et du dessous. Ce dernier est donc distribué par le phloème dans les deux directions. Comme son métabolite, l'imidaclopride sort de la feuille traitée par voie phloémienne mais il est rapidement réabsorbé par le xylème d'où il reprend une distribution xylémienne ascendante.

Dans les feuilles, deux autres métabolites plus polaires que l'oléfine ont été détectés. Mais ils ne semblent pas être remobilisés, tout au moins la distinction entre remobilisation et métabolisme ne peut être faite pas nos expérimentations.

Au niveau du fruit, les deux voies concourent au flux d'eau et peuvent donc amener des résidus dans le fruit. Lors d'un traitement du sol, le flux xylémien est le plus important car il est plus fortement chargé en résidus en provenance directe du sol. Par contre, lors d'un traitement foliaire, les deux voies semblent équivalentes pour contaminer le fruit comme l'ont montré nos expériences d'inactivation du phloème. L'apparente contradiction trouvée après traitement racinaire entre les concentrations instantanées, saturables, et les concentrations cumulées constantes au cours du temps, pourrait être expliquée par une compensation de la saturation xylémienne due à l'âge des fruits par le flux phloémien transférant une partie des résidus accumulés dans les feuilles. L'analyse métabolique des fruits n'a cependant pas permis de vérifier ce point.

Nous avons toutefois montré que dans le cas d'un transfert à partir du sol, le fruit est essentiellement contaminé par l'imidaclopride. Le seul métabolite détecté, très polaire, n'a pu être identifié. Son origine ne peut donc être établie mais nous avons aussi montré que le fruit possédait sa propre capacité métabolique et qu'il pouvait générer, entre autres, ce métabolite très polaire. Cette capacité métabolique varie selon le degré de maturité des fruits. Malgré cela, les autres métabolites détectés ex vivo, en particulier la guanidine qui pourrait poser un problème de sécurité alimentaire, n'ont pas été mis en évidence.

D'autre part, à cause du faible temps de croissance des fruits au regard du temps d'exposition des feuilles, les fruits sont peu sensibles à la diminution de la biodisponibilité des résidus que nous avons montré dans le sol.

Enfin, nous montrons que le faible taux de contamination des fruits, qui avait été imputé à une adsorption des résidus sur les parois du xylème, soit dû avant tout à la faiblesse du flux xylémien entrant dans le fruit de tomate. La contamination par voie phloémienne que nous avons montrée n'est cependant pas suffisamment importante pour accroître de manière risquée le taux de résidus d'imidaclopride dans les fruits, particulièrement dans le cas d'un traitement foliaire.

Cependant, il ne faut pas utiliser l'imidaclopride de façon excessive à partir d'un traitement racinaire puisque comme nous l'avons montré, il y a une relation linéaire entre la concentration de cette molécule dans le sol et les concentrations dans la plante et par conséquent dans les fruits.

Ce travail a permis de mettre en évidence certains mécanismes de transfert des résidus d'imidaclopride dans les fruits. Cette molécule avait été choisie comme modèle d'étude à cause de ces caractéristiques physico-chimiques qui permettaient a priori une distribution dans la plante par voie xylémienne, ce que nous avons vérifié. Cependant, le but était ensuite de déterminer si certains de ces métabolites, notamment les résidus conjugués à des molécules glycosidiques, pouvaient à leur tour être transférés de leur site de synthèse, les feuilles, vers d'autres sites du végétal, en particulier vers les fruits. Dans ce cadre, cette thèse n'est qu'une partie de l'étude car volontairement nous avons utilisé un radiomarquage de l'imidaclopride sur le cycle imidazolidine qui ne permettait pas le suivi de ces composés, les résidus conjugués de l'acide chloronicotinique obtenus après scission de l'imidaclopride au niveau de son pont méthylène.

Cette seconde partie de l'étude devra donc être entreprise pour déterminer si des résidus conjugués à des sucres possédant des propriétés physico-chimiques proches des assimilats photosynthétiques pouvaient être remobilisés pour être transférés en parallèle des assimilats vers les fruits.

D'autre part à côté de cela, qui est le thème principal de cette recherche, ce travail a aussi mis en évidence certains points qu'il est nécessaire de vérifier ou de démontrer. Ainsi, d'un point de vue du métabolisme, plusieurs aspects restent non élucidés. Tout d'abord la nature du résidu polaire dont l'identification est primordiale d'un point de vue sécurité chimique. D'autant plus que ce résidu polaire ne pourrait être qu'un faux métabolite résultant de la réincorporation de CO₂ radiomarké provenant de l'ouverture du cycle guanidique du métabolite dénitrifié. Cela rejoint donc un autre point qui est la détermination du devenir du métabolite foliaire principal, la guanidine. Un autre métabolite, que nous avons mis en évidence pour la première fois, le dérivé 3,4-déhydro-5-oxo-imidaclopride serait intéressant à suivre pour déterminer s'il résulte d'une oxydation biologique ou abiotique, et dans le premier cas s'il peut être un intermédiaire de la voie de formation de l'oléfine.

D'un point de vue flux à l'intérieur de la plante, il serait utile de vérifier la nature exacte des métabolites non conjugués dont nous avons montré qu'ils pouvaient être transférés par voie phloémienne et surtout leur capacité de mobilisation au cours de la croissance des fruits.

Il serait aussi important pour la compréhension des mécanismes de transfert vers les fruits d'étudier la contamination des fruits des bouquets supérieurs par comparaison avec les trois bouquets les plus bas que nous avons étudiés ici.

Enfin, ces transferts devraient conduire à une modélisation axée non pas sur le transfert global dans la plante mais en prenant le fruit comme point d'impact principal. Pour ce faire, il faudrait d'abord établir le ratio entre transfert phloémien et xylémien qui n'a été approché que de manière très succincte. Notamment, notre hypothèse d'équivalence des flux devra être confirmée par un calcul modélisé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

A

Anderson, C.; Fritz, R.; Brauner, A. **1990a**. Metabolism of [pyridinyl-14C-methylene] NTN 33893 in loamy soil BBA 2.2 under aerobic conditions. Bayer AG, Report N° PF3321. In IMIDACLOPRID (206) First draft prepared by Ursula Banasiak, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Kleinmachnow, Germany pp 727-729.

Anderson, C.; Fritz, R.; Brauner, A. **1990**. Metabolism of [pyridinyl-14C-methylene] NTN 33893 in sandy loam under aerobic conditions. Bayer AG, Report N° PF3433, 11-14. In IMIDACLOPRID (206) First draft prepared by Ursula Banasiak, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Kleinmachnow, Germany pp 727-729.

Araki, Y.; Bornatsch, W.; Brauner, A.; Clark, T.; Dräger, G.; Kuroguchi, S.; Sakamoto, H.; Vogeler, K. **1994**. Metabolism of imidacloprid in plants. *Proc IUPAC Congress*, Washington 2B.157.

Ascherio, A.; Chen, H.; Weisskopf, M. G.; O'Reilly, E. McCullough, M. L.; Calle, E. E.; Schwarzschild, M. A.; Thun, M. J. **2006**. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, **60**,197-203.

Ashton, F. M.; Zweig, G.; Mason, G. **1960**. The effect of certain triazines on ¹⁴CO₂ fixation in red kidney beans. *Weeds*, **8**, 448–451.

Atherton, J. G.; Harris, G. P. Flowering. In *The tomato crop*. J. G. Atherton; J. Rudish, Eds, Chapman and Hall, London, 1986, pp 167-194.

B

Bacci, E.; Calamari, D.; Gaggi, C.; Vighi, M. **1990**. Bioconcentration of organic chemical vapors in plant leaves: Experimental measurements and correlation. *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 885-889.

Barrett, M. The role of cytochrome P450 enzymes in herbicide metabolism. In *Herbicides and Their Mechanisms of Action*. A. H. Cobbs, R. C. Kirkwood, Eds, Sheffield, Great Britain, Sheffield Academic, 2000, pp 25–37.

Belda, R. M.; Fenlon, J. S.; Ho, L. C. **1996**. Salinity effect on the xylem vessels in tomato fruit among cultivars with different susceptibility to blossom–end rot. *J. Hortic. Sci.*, **71**,173-179.

Bonnemain, J. L. **1965**. Sur le transport diurne des produits d'assimilation lors de la floraison chez la tomate. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris*, **260**, 2054-2057.

Bonnemain, J. L. **1966**. Sur les modalités de la distribution des assimilats chez la tomate et sur ces mécanismes. *Compte Rendu de l'Académie des sciences de Paris*, **262**, 1106-1109.

Bonmatin, J. M.; Moineau, I.; Charvet, R.; Fleche, C.; Colin, M.E.; Bengsch, E. R. **2003**. LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Anal. Chem.*, **75**, 2027-2033.

Bonmatin, J. M.; Moineau, I.; Charvet, R.; Colin, M.-E. ; Fléché, C.; Bengsch, E. R. Behaviour of imidacloprid in fields. Toxicity for honey bees. In *Environmental Chemistry*. E. Lichtfouse, Ed, Springer, Berlin, Germany, 2005, pp 483-494.

Brenner, S. **1988**. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature*, **334**, 528–530.

Briggs, G. G.; Bromilow, R. H.; Evans, A. A.; Williams, M. **1982**. Relationship between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pestic. Sci.*, **13**, 495-504.

Briggs, G. G.; Bromilow, R. H.; Evans, A. A.; Williams, M. **1993**. Relationship between lipophilicity and the distribution of non-ionised chemicals in barley shoots following uptake by the roots. *Pestic. Sci.*, **14**, 492-500.

Briggs, G. G. Factors affecting the uptake of soil applied chemicals by plants and other organisms. In *Proc. BCPC Symp. Soils and Crop Protection Chemicals*; R. Hance, Ed, Monograph 27, British Crop Protection Council, Croydon, 1984, p 35.

Briggs, G. G.; Rigitano, R. L. O.; Bromilow, R. H. **1987**. Physicochemical factors affecting uptake by roots and translocation to shoots of weak acids in barley. *Pestic. Sci.*, **19**, 101-112.

Bromilow, R. H., Rigitano, R. L. O., Briggs, G. G.; Chamberlain, K. **1987**. Phloem translocation of non-ionised chemicals in *Ricinus communis*. *Pestic. Sci.*, **19**, 85-99.

Bromilow, R. H.; Chamberlain, K.; Evans A. A. Molecular structure and properties of xenobiotics in relation to phloem translocation. In *Phloem transport and assimilate compartmentation*. J. L. Bonnemai, S. Delrot, W. J. Lucas, J. Dainty, Eds, Ouest Edition Presses Académiques, 1991, pp 332-340.

Buchholz, A.; Nauen, R. **2001**. Translocation and translaminar bioavailability of two neonicotinoid insecticides after foliar application to cabbage and cotton. *Pest Manag. Sci.*, **58**, 10-16.

C

- Cabanne, F.; Huby, D.; Gaillardon, P.; Scalla, R.; Durst, F. **1987**. Effect of the cytochrome P-450 inactivator 1-aminobenzotriazole on the metabolism of chlortoluron and isoproturon in wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **28**, 371–380.
- Calvert, A. **1965**. Flower initiation and development in the tomato. *N. A. A. S. Quarterly Rev.*, **70**, 79-88.
- Camper, N. D.; McDonald, S. K. **1989**. Tissue and cell cultures as model systems in herbicide research. *Rev. Weed Sci.*, **4**, 169-190.
- Canivenc, M. C.; Cagnac, B.; Cabanne, F.; Scalla, R. **1989**. Induced changes of chlorotoluron metabolism in wheat cell suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.*, **27**, 193–201.
- Casida, J. E.; Lykken, L. **1969**. Metabolism of organic pesticide chemicals in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**, 607-36.
- Capri, E.; Camisa, M. G.; Flores-Cespedes, F.; Glass C. R.; Gonzalez-Pradas, E.; Trevisan, M. **2001**. Imidacloprid and pyrimethanil soil sorption. *Agronomie*, **21**, 57-64.
- Chamberlain, K.; Patel, S.; Bromilow, R. H. **1998**. Uptake by roots and translocation to shoots of two morpholine fungicides in barley. *Pestic. Sci.*, **54**, 1-7.
- Clark, T.; Kaußmann, E.; Römer, E.; Schepers, G. **1998**. The fate of imidacloprid in tobacco smoke of cigarettes made from imidacloprid-treated tobacco. *Pestic. Sci.*, **52**, 119–125.
- Cole, D. J. Oxidation of xenobiotics in plants. In *Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology*. D. H. Hutson, T. R. Roberts, Eds, John Wiley & Sons, Chichester, 1983, Vol 3, pp 199-254.
- Colloque cancers professionnels ARC / FNATH – 03 / 2006, la dépêche de l'AFP : Les pesticides font augmenter le risque de tumeur cérébrale (Cyberpresse Sciences, 22.03.06)

D

- Davies, J. N.; Hobson, G. E. **1981**. The constituent of tomato fruit - the influence of environment, nutrition and genotype. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **15**, 205- 280.
- Dickson, R. E. Assimilate distribution and storage. In *Physiology of trees*. A. S. Raghavendra, Ed, Wiley, 1991, pp 51-86.
- Draeger, G.; Bornatsch, W.; Brauner, A. **1989**. NTN 33893-Metabolism in tomatoes. Bayer AG, Report No.PF3257. In IMIDACLOPRID (206) First draft prepared by Ursula Banasiak,

Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Kleinmachnow, Germany p 710.

E

Ebing, W.; Haque, A.; Schuphan, I.; Harms, H.; Langebartels, C.; Scheel, D.; von der Trenk, K.T.; Sandermann, H. Jr. **1984**. Ecochemical assessment of environmental chemicals: Draft guideline of the test procedure to evaluate metabolism and degradation of chemicals by plant cell cultures. *Chemosphere*, **13**, 947-957.

Edgington, L. V.; Peterson, C. A. Systemic fungicides: Theory, uptake, and translocation. In *Antifungal Compounds*. M. R. Siegel, H. D. Sisler, Eds, Marcel Dekker, New York, 1977, Vol 2, p 511.

Edwards, V. T.; McMin, A. L. Biotransformation of pesticides and other xenobiotics in plants and soils - recent developments. In *Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology*. D. H. Hutson, T. R. Roberts, Eds, John Wiley & Sons, Chichester, 1995, Vol 4, pp 103-164.

Erhet, D. L.; Ho L. C. **1986**. Translocation of calcium in relation to tomato fruit growth. *Ann. Bot.*, **58**, 679- 688.

Eschrich, W. **1980**. Free space invertase, its possible role in phloem loading. *Ber. Deutsch Bot. Ges.* **93**, 363- 378.

Étude menée en 2002 par la Direction de la santé et de la protection des consommateurs de la Commission européenne (DG SANCO).

Evaluation of the hazards to consumers resulting from the use of fumigants in the protection of food. FAO Meeting Report, No. PL/ 1965/10/2;WHO/FoodAdd./28.65,1965.

F

Fahl, U.; Leicht, W. **2001**. Recalculation of imidacloprid half-life in soil according to 1 st order statistics. Byer AG, Report No. M10150. In IMIDACLOPRID (206) First draft prepared by Ursula Banasiak, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Kleinmachnow, Germany pp 727-729.

Farm Chemicals Handbook. R. T. Meister, Ed, Meister Publishing Company, Willoughby, 1995.

Farm Chemicals Handbook. R. T. Meister, Ed, Meister Publishing Company, Willoughby, 1994.

Formella, T. M.; Cink, J. H. **1997**. Imidacloprid (NTN33893) turf dissipation in North Carolina, 1992. Bayer AG, Report N° BR107384. In IMIDACLOPRID (206) First draft prepared by Ursula Banasiak, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Kleinmachnow, Germany pp 727-729.

Frear, D. S.; Still, G. G. **1968**. The metabolism of 3,4-dichloropropionanilide in plants. Partial purification and properties of an aryl acylamidase from rice. *Phytochemistry*, **7**, 913–920.

Fujisawa, T.; Ichise, K.; Fukushima, M.; Katagi, T.; Takimoto, Y. **2002**. Improved uptake models of nonionized pesticides to foliage and seed of crops. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 532-537.

Federal Register. Imidacloprid; Pesticide Tolerances. July 5 **1995**, **60**(128), 34943-24945.

G

Gaillardon, P.; Cabanne, F.; Scalla, R.; Durst, F. **1985**. Effect of mixed function oxidase inhibitors on the toxicity of chlortoluron and isoproturon to wheat. *Weed Res.*, **25**, 397–402.

Gauvrit, C.; Grangeot, M.; Chauvel, B. **2006** Les paradoxes du glufosinate et du glyphosate: comportement dans la feuille d'armoise. *Phytoma, La défense des végétaux*, **591**, 8-11.

Guichard, S.; Gary, C.; Leonardi, C.; Bertin, N. **2005**. Analysis of growth and water relations of tomato fruits in relation to air vapor pressure deficit and plant fruit load. *J. Plant Growth Regul.*, **24**, 201-213.

H

Harms, H. H. **1992**. *In-vitro* systems for studying phytotoxicity and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants. *Pestic. Sci.*, **35**, 277-281.

Hawxby, K., Basler, E.; Santelmann, P. W. **1972**. Temperature effects on absorption and translocation of trifluralin and methazole in peanuts. *Weed Sci.*, **20**, 285-289.

Hay, J. R. Herbicide transport in plants. In *Herbicides Physiology, Biochemistry, Ecology*. U. Audus, Ed, Academic Press, New York, 1976, Vol 2, pp 373-374.

Ho, L. C. **1980**. Control of import into tomato fruits. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **93**, 315-325.

Ho, L. C. **1988**. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**, 355-378.

Ho, L. C.; Baker, D. A. **1982**. Regulation of loading and unloading in long distance transport systems. *Physiol. Plant.*, **56**, 225-230.

Ho, L. C.; Adkin, M. P.; Wareing, P. F. **1981**. Possible role of growth regulators in the sucrose unloading process in tomato fruits. *Annual Report of the Glasshouse Crops Research Institute for 1980*, 35.

Ho, L. C. Grange R. I.; Piken, A.J. **1987**. An analysis of the accumulation of water and dry matter in tomato fruit. *Plant Cell Environ.*, **10**, 157-162.

Hoagland, R. E.; Graf, G. **1972**. An aryl acylamidase from tulip which hydrolyzes 3',4'-dichloropropionanilide. *Phytochemistry*, **11**, 521-527.

Hoagland, R. E. **1975**. Hydrolysis of 3',4'-dichloropropionanilide by an aryl acylamidase from *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry*, **14**, 383-386.

Hoagland, R. E.; Zablotowicz, R. M. The role of plant and microbial hydrolytic enzymes in pesticide metabolism. In *Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences*. J. C. Hall, R. E. Hoagland, R. M. Zablotowicz, Eds, ACS Symposium Series 777, Washington, DC: American Chemical Society, 2001, pp 58-88.

Hopkins, W. G. Transport and distribution of photoassimilates. In *Introduction to Plant Physiology*, De Boeck & Larcier, Eds, John Wiley & Sons Inc., 1999, pp 215-233.

Hosokawa, S.; Miyamoto, J. **1974**. Metabolism of ¹⁴C-labelled sumithion, *O*, *O*- dimethyl *O*-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate in apples. *Botyu – Kagaku*, **39**, 49-53.

Hsu, F. C.; Kleier, D. A.; Melander, W. R. **1988**. Phloem mobility of xenobiotics. II. Testing of the unified mathematical model. *Plant Physiol.*, **86**, 811-816.

<http://www.univers-nature.com/dossiers/pesticides/>

http://www.mdrgf.org/pdf/NYAS_1076_765_777%20final.pdf

<http://www.pesticides-etudes.mdrgf.org/2006/03/insecticides-mnagers-et-leucmie-chez.html>

http://pesticides.free.fr/article.php3?id_article=1

<http://www.pesticides-etudes.mdrgf.org/2006/03/baisse-de-la-fertilite-les-pesticides.html>

<http://www.eufic.org/article/fr/page/BARCHIVE/expid/basics-securite-alimentaire/?lowres=1>

Direction Générale de la Santé et de la Consommation

http://ec.europa.eu/food/fvo/specialreports/pesticides_index_en.htm

http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/03_publications/com_ddp/residuspesticides.pdf

H:\Biotransformation.htm

Hung, H.; Mackay, D. **1997**. A novel and simple model of the uptake of organic chemicals by vegetation from air and soil. *Chemosphere*, **35**, 959-977.

I

Imidacloprid (206) First draft prepared by Ursula Banasiak, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Kleinmachnow, Germany pp727-729 (www.fao.org/ag/agp/agpp/Pesticid/JMPR/Download/2002_eva/IMIDA_EVjjb).

J

Jachetta, J. J; Appleby, A. P; Boersma, L. **1986**. Apoplastic and Symplastic Pathways of Atrazine and Glyphosate. *Plant Physiol.*, **82**, 1000-1007.

K

Katagi, T.; Mikami, N. Primary metabolism of agrochemicals in plants. In *metabolism of agrochemicals in plants*. T. Roberts, Ed, John Wiley & Sons, LTD, New York, 2000, pp 43-106.

Kawabata, S.; Sasaki, H.; Sakiyama, R. **2005**. Role of transpiration from fruits in phloem transport and fruit growth in tomato fruits. *Physiol. Plant.*, **124**, 371-380.

Kinet, J. M. **1977**. Effect of light condition on the development of the inflorescence in tomato. *Sci. Hortic.*, **6**, 15-26.

Kleier, D. A. **1988**. Phloem mobility of xenobiotics. I. Mathematical model unifying the weak acid and intermediate permeability theories. *Plant Physiol.*, **86**, 811-816.

Koester, J. **1992**. Comparative metabolism of [pyridinyl-¹⁴Cmethyl] imidacloprid in plant cell suspension cultures. *Proc. Brighton Crop Prot. Conf. Pest Dis.*, **2**, 901-906.

Komoßa, D.; Langebartels, C.; Sandermann, H. Metabolic Processes for organic chemicals in plants. In *Plant Contamination Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. S. Trapp, J. C. Mc Farlane, Eds, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1995, pp 69–103.

Krammer, C. S. **1990**. Food safety: the consumer side of the environmental issue. *J. Agr. Econ.*, **21**, 33-46.

Krohn, J., HellPointner, E. **2002**. Environmental fate of imidacloprid. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*. **55**, 1-26.

L

- Lamoureux, G. L.; Frear, D. S. Pesticide metabolism in higher plants: in vitro enzyme studies. In *Xenobiotics Metabolism: In Vitro Methods*. G. D. Paulson, D. S. Frear, E. P. Marks, Eds, ACS Symp. Ser, Amer.Chem.Soc., Washington DC, 1979, 97, pp 77-128.
- Laurent, F. M.; Rathahao, E. **2003**. Distribution of [^{14}C] imidacloprid in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 8005–8010.
- Lee, W. Y. L. **2003**. Plant uptake and translocation of air-born chlordane and comparison with the soil to plant route. *Chemosphere*, **53**, 111-121.
- Lee, W. **2004**. Cancer Incidence among Pesticide Applicators Exposed to Alachlor in the Agricultural Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, **159**, 373-380.
- Lee, D. R. **1989**. Vasculature of the abscission zone of tomato fruit /implication for transport. *Can. J. Bot.*, **67**, 1898-1902.
- Lichtenstein, E. P. **1959**. Absorption of some chlorinated hydrocarbon insecticides from soils into various crops. *J. Agric. Food. Chem.*, **14**, 62–65.
- US EPA (Unites States Environmental Protection Agency). **1995**. Imidaclopride; Tolerance of pesticide and agricultural products.

M

- Mattina, M. J. I., Ianucci-Berger, W., Dykas, L. **2000**. Chlordane uptake and its translocation in food crops. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1909–1915.
- Matsunaka, S. **1968**. Propanil hydrolysis: inhibition in rice plants by insecticides. *Science*, **160**, 1360–1361.
- McCardy, J. K.; McFarlane, C.; Lindstrom, F. T. **1987**. The transport and affinity of substituted benzenes in soybean stems. *J. Exp. Bot.*, **38**, 1875-1890.
- McLachlan, M.S. **1996**. Bioaccumulation of hydrophobic chemicals in agricultural food chains. *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 252–259.
- Menéndez, J.; De Prado, R. **1997**. Detoxification of chlorotoluron resistant biotype of *Alopecurus myosuroides*. Comparison between cell cultures and whole plants. *Physiol Plant*, **99**, 97–104.

Menzer, R. E. **1973**. Biological oxidation and conjugation of pesticidal chemicals, *Res. Rev.*, **48**, 79-116.

Mohr, H.; Schopfer, P. **1995**. Physiology of phloem transport. In *Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, p 493.

Merlina, G., Lemperiere, G., Calmon, J. P. **1994**. Determination and uptake of carbosulfan and carbofuran in young douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb.). *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1569-1571.

Moins de résidus de pesticides sur les fruits et légumes ? (PESTInfos 30.01.06).

Mukherjee, I.; Gopal, M. **2000**. Environmental behaviour and translocation of imidacloprid in eggplant, cabbage and mustard. *Pest Manag. Sci.*, **56**, 932-936.

Mumma, R. O.; Hamilton, R. H. Xenobiotic metabolism in higher plants: *in vitro* tissue and cell culture techniques. In *Xenobiotic metabolism: in vitro methods*. G. D. Paulson, D. S. Frear, E. P. Marks, Eds, *ACS Symposium Series 97*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1979, pp 35–76.

Mumma, R. O.; Hamilton, R. H. **1983**. Advances in pesticide metabolite identification through the use of plant tissue cultures. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **197**, 535-555.

N

Nauen, R.; Reckmann, U.; Armbrorst, S.; Stupp, H. P.; Elbert, A. **1999**. Whitefly-active metabolites of imidacloprid: biological efficacy and translocation in cotton plants. *Pestic. Sci.*, **55**, 265-271.

Nauen, R.; Tietjen, K.; Wagner, K.; Elbert, A. **1998**. Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Sci.*, **52**, 53–57.

Nitsch, J. P. Perennation through seeds and other structures: fruit development. In *plant physiology: a treatise*. F. C. Steward, Ed, Academic Press, New York, 1971, vol 6A, pp 413-501.

Norsworthy, J. K.; Talbert, R. E.; Hoagland, R. E. **1999**. Chlorophyll fluorescence evaluation of agrochemical interactions with propanil on propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Weed Sci.*, **47**, 13–19.

O

Ockenden, W. A.; Steinnes, E.; Parker, C.; Jones, K. C. **1998**. Observations on persistent organic pollutants in plants: Implications for their use as passive air samplers and for POP cycling. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 2721–2726.

Oi, M. **1999**. Time-Dependent Sorption of Imidacloprid in Two Different Soils. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 327-332.

Olson, E.R.; Dively, G.P.; Nelson, J.O. **2004**. Bioassay Determination of the Distribution of Imidacloprid in Potato Plants: Implications to Resistance Development. *J. Econ. Entomol.*, **97**, 614-620.

P

Paterson, S.; Mackay, D. Interpreting chemical partitioning in soil-plant-air systems with a fugacity model. In *Plant Contamination*. S. Trapp, J. C. McFarlane, Eds, CRC Press, Boca Raton, 1995; pp 191-214.

Pike, K. S.; Reed, G. L.; Graf, G. T.; Allison, D. **1993**. Compatibility of Imidacloprid with Fungicides as a Seed-Treatment Control of Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphidae) and Effect on Germination, Growth, and Yield of Wheat Barley. *J. Econ. Entomol.*, **86**, 586-593.

Picken, A. J. F., Stewart, K.; Klapwijk, D. Germination and vegetative development. In *The Tomato crop*. J. G. Atherton, J. Rudish, Eds, Chapman and Hall, London, 1986, pp 111-157.

Philpot, J. D.; Yen, P. Y. **1998**. Terrestrial field dissipation of imidacloprid on turf in Ontario, Canada, **1994**. Bayer Corporation, Stilwell, KS, USA. Bayer AG, Report N° BR107817. In Imidacloprid (206) First draft prepared by Ursula Banasiak, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Kleinmachnow, Germany pp 727-729.

Price, C. E., Movement of xenobiotics in plants perspectives. In *Advances in Pesticide Science*. Proc. 4th IUPAC Congress; H. Geissbuhler, Ed, 1979, 3, pp 401-409.

Probst, G. W.; Tepe, J. B. Trifluralin and related compounds. In *Degradation of Herbicides*. P. C. Kearney, D. D. Kaufman, Eds, New York, Marcel Dekker, 1969, pp 255–282.

Pesticide residues in food **2006**, Joint FAO / WHO Meeting on pesticide Residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues Rome, Italy, 3-10 October 2006.

R

- Raven, J. A. **1975**. Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol.*, **74**, 163-172.
- Riederer, M. Partitioning and transport of organic chemicals between the atmospheric environment and leaves. In *Plant Contamination*. S. Trapp, J. C. McFarlane, Eds, CRC Press, Boca Raton, 1995, pp 153-190.
- Rouchaud, J.; Gustin, F.; Wauters, A. **1996**. Imidacloprid insecticide soil metabolism in sugar beet field crops. *Pestic. Sci.*, **56**, 29-36.
- Rouchaud J, Gustin F.; Wauters, A. **1994**. Soil biodegradation and leaf transfer of insecticide imidacloprid applied in seed dressing in sugar beet crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **53**, 344-350.
- Rusness, D. G.; Lamoureux, G. L. **1980**. Pentachloronitrobenzene fungicide metabolism in peanut. 2. Characterization of chloroform-soluble metabolites produced in vivo. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1070–1077.
- Ryan, J. A.; Bell, R. M.; Davidson, J. M.; O'Connor, G.A. **1988**. Uptake of nonionic organic chemicals from soils. *Chemosphere*, **17**, 2299-2323.

S

- Sander mann, H.; Diesperger, H.; Scheel, D. Metabolism of xenobiotics by plant cell cultures. In *Plant cell Tissue Culture and Its Biotechnological Application*. W. Barz, E. Reinhard, M. H. Zenk, Eds; Springer-Verlag, Berlin, 1977, pp 178-196.
- Sander mann, H. **1992**. Plant metabolism of xenobiotics, *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 82-84.
- Sander mann, H. **1987**. Pestizid-Rückstände in Nahrungspflanzen, Die Rolle des pflanzlichen Metabolismus. *Naturwissenschaften*, **74**, 573-578.
- Sarkar, M. A.; Sankhajit R.; Kole, R. K.; Chowdhury, A. **2001**. Persistence and metabolism of imidacloprid in different soils of West Bengal. *Pest Manag. Sci.*, **57**, 598-602.
- Satchivi, N. M.; Stoller, E. W.; Wax, L. M. **2000**. Briskin, D. P. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **68**, 67-84.
- Scheunert, I. Prediction of chemical's behavior in soil–plant systems from physiochemical properties. In *Environmental modeling for Priority Setting among Existing Chemicals*. Proceedings of GSF Workshop, Munich, nov 11-13, 1985, pp 279-298.

Schlagbauer, B. G. L.; Schlagbauer, A. W. J. **1972**. The metabolism of carbamate pesticides - A literature analysis. Part I. *Residue Rev.*, **42**, 1-84.

Schmidt, B.; Siever, M.; Thiede, B.; Breuer, J.; Malcherek, K.; Schuphan, I. **1997**. Biotransformation of [ring-U-¹⁴C]atrazine to dealkylated and hydroxylated metabolites in cell-suspension cultures. *Weed Res.*, **37**, 401-410.

Scholtz, K.; Spitzteller, M. **1992**. Influence of ground cover on the degradation of ¹⁴C-imidacloprid in soil. *Brighton Crop Prot. Conf. Pest Dis.*, **2**, 883-888.

Scholtz, K. **1992**. Degradation of NTN 33893 in soil with groundcover. Bayer AG, Report N° PF3438. In IMIDACLOPRID (206) First draft prepared by Ursula Banasiak, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Kleinmachnow, Germany pp727-729.

Schroll, R., Scheunert, I. **1992**. Uptake of the lipophilic model compound hexachlorobenzene by different plant species during the vegetation period. *Fresenius Environ. Bull.*, **1**, 334-338.

Schwarzschild, M. A.; Thun, M. J. **2006**. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol.*, **60**, 197-203.

Schuphan, I.; Haque, A.; Ebing, W. **1984**. Ecochemical assessment of environmental chemicals: Standard screening procedure to evaluate chemicals in plant cell cultures. *Chemosphere*, **13**, 301-313.

Siasni, M., Deckers, W., Schmidt, K. and Simon, H. **1969**. Translocation penetration, and metabolism of O-(4-bromo-2,5-dichlorophenyl)-O, O-dimethylphosphorothioate (bromophos) in tomato plants. *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 1017-1020.

Shone, M. G. T.; Wood, A. V. **1974**. A comparison of the uptake and translocation of some organic herbicides and a systemic fungicide by barley. I. Absorption in relation to physiochemical properties. *J. Exp. Bot.*, **25**, 390-400.

Shone, M. G. T.; Bartlet, B. O.; Wood, A. V. **1974**. A comparison of the uptake and translocation of some organic herbicides and a systemic fungicide by barley. II. Relationship between uptake by roots and translocation by shoots. *J. Exp. Bot.*, **25**, 401-409.

Sicbaldi, F.; Sacchi, G. A.; Trevisan, M.; Delre, A. A. M. **1997**. Root uptake and xylem translocation of pesticides from different Chemical Classes. *Pestic. Sci.*, **50**, 111-119.

Stein-Donnecke, U. **1993**. Beizhofausbildung, Aufnahme Translokation und Wirkung von [¹⁴C] imidacloprid bei winterweizen und Zuckeruben nach saatgutbehandlung und unter dem

Einfluss verschiedener boden feuchten. PhD Thesis Institut für Radioagronomie. Forschungszentrum Julich GmbH, ISSN, 0944-2951, Jul-2847.

Stein-Donnecke, U.; Führ, F.; Wienecke, J.; Hartwig, J.; Leicht, W. **1992**. Influence of soil moisture on the formation of dressing zones and uptake of imidacloprid after seed treatment of winter wheat. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, **45**, 327-368.

Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces, L. P. **2001**. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**, 2482–2486.

T

The Agrochemicals Handbook, Third Edition; Kidd, H., James, D. R., Eds; Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, **1994**.

Tomlin, C. D. S. The e-pesticide Manual, fourteenth Edition. P C CD-ROM. Version 4.0, 2006-2007.

Topp, E.; Scheunert, I.; Attar, A; Korte, F. **1986**. Factors affecting the uptake of ¹⁴C labeled chemicals by plants from soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **11**, 219-228.

Trapp, S. Model for uptake of xenobiotics into plants. In *Plant contamination*. S. Trapp, J. C. McFarlane, Eds, CRC Press, Boca Raton, 1995, pp 107-151.

Trapp, S.; Pussemier, L. **1991**. Model calculation and measurements of uptake and translocation of carbamates by bean plants. *Chemosphere*, **22**, 327-339.

Trapp, S., Matthies, M., Scheunert, I.; Topp, E. **1990**. Modeling the bioconcentration of organic chemical in plant. *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 1246-1252.

Trapp, S.; Matthies, M. **1995**. Genetic one-compartment model for uptake of organic chemicals by foliar vegetation. *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 2333–2338.

Tröltzsch, C. M.; Führ, F.; Wieneke, J.; Elbert, A. **1994**. Einflußunterschiedlicher Bewässerungsverfahren auf die Aufnahme von Imidacloprid durch Baumwolle nach Saatgutbeizung. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, **47**, 249-303.

Tukey, H. B.; Young, J. O. **1939**. Histological study of the developing fruit of the sour cherry. *Bot. Gaz.*, **100**, 723-749.

Tukey, H. B.; Young, J. O. **1942**. Gross morphology and histology of developing fruit of the apple. *Bot. Gaz.*, **104**, 3-25.

U

Uchida, M. **1980**. Affinity and mobility of fungicidal dialkyl dithiolanylidene malonates in rice plants. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **14**, 249-255.

United States. Environmental Protection Agency. **1995**. Imidacloprid; Pesticide Tolerance and Raw Agricultural commodities. 40 CFR Part 180 Section 472.

V

Van Eerd, L. L. **2003**. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Sci.*, **51**, 472-495.

Vonk, J. W. Metabolism of fungicides in plants. In *Progress in pesticides Biochemistry and Toxicology*. D. H. Hutson, T. R. Roberts, Eds, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 1983, Vol 3, pp 111-162.

W

Walker, A. J.; Thornley, J. H. M. **1977**. The tomato fruit: import, growth, respiration and carbon metabolism at different fruit sizes and temperature. *Ann. Bot.*, **41**, 977-985.

Waring, P. F.; Patrick, J. Source-sink relations and the partition of assimilates in the plant. In *Photosynthesis and productivity in different Environments*. J. P. Cooper, Ed, Cambridge, Cambridge University Press, 1975, pp 481-499.

Westwood, F.; Bean, K. M.; Dewar, A. M.; Bromilow, R. H.; Chamberlain, K. **1998**. Movement and persistence of [¹⁴C] imidacloprid in sugar-beet plants following application to pelleted sugar-beet seed. *Pestic. Sci.*, **52**, 97-103.

White, J. C.; Mattina, M. J. I. Eitzer, B. D.; Berger, W. I. **2002**. Tracking chlordane compositional and chiral profiles in soil and vegetation. *Chemosphere*, **47**, 639-646.

Wolterbeek, H. T. H.; Willemse, P. C. M.; Vandie, J. **1987**. Phloem and xylem import of water and solutes in tomato fruits. *Acta Bot. Neerl.*, **36**, 295-306.

Z

Zablotowicz, R. M.; Locke, M. A.; Hoagland, R. E. Aromatic nitroreduction of acifluorfen. In *Soils, rhizospheres, and pure cultures of rhizobacteria*. E. L. Kruger, T. A. Anderson, J. R.

Coats, Eds, Phytoremediation of Soil and Water Contaminants, ACS Symposium Series 664, Washington, DC, American Chemical Society, 1997, pp 38–53.

Zayed, S. M. A. D.; Faraghaly, M.; Mahdy, F. **1998**. Effect of commercial processing procedures on carbofuran residues in soybean oil. *Food Chem.*, **62**, 265-268

ANNEXES

MILIEU DE CULTURE DE CELLULES DE TOMATE

MSMO

Préparer une solution de NAA 10 mg / ml dans de l'éthanol (stock à 4°C).

Préparer une solution de BA 23 mg / L H₂O milli Q.

H₂O milli Q	1Litre	2 Litre
MS M-6899	dose	dose
SUCROSE	30 g	60 g
MYO-INOSITOL	0,4 g	0,8 g
ACIDE ALPHA-NAPHTALENE ACETIQUE (NAA)	0,1 ml	0,2
BENZYLAMINOPURINE (BA ou BAP)	10 ml	20 ml

Ajuster le pH à 5,5 avec KOH

Pour le milieu gélosé rajouter 10 g de Bacto Agar / L.

Autoclaver à 120 °C pendant 20 min.

Ajouter les vitamines AT 1000x dans chaque erlen, 0,25 ml.

Composition

Terre végétale

Matières organique végétales vieilles

Caractéristiques

Matière sèche : 65 % en masse du produit brut

Matière organique : 12 % en masse du produit sec

Capacité de rétention d'eau 250ml/L

Extrait aqueux 1/1,5 1/5

PH (H₂O) : 6,2 6,5

Conductivité : 0,3 0,15 ms/cm

Fertilisante:

Composition:

ENGRAIS CE.

Solution N.P.K 6.6.6.6. Avec oligo –éléments.

6% d'azote (N) total dont:

2,2 % d'azote (N) nitrique; 1,2 % d'azote (N) ammoniacal; 2,6% d'azote (N) uréique.

6% d'anhydride phosphorique (P₂O₅) soluble dans l'eau.

6% d'oxyde de potassium (K₂O) soluble dans l'eau.

Oligo –éléments soluble dans l'eau: 0,016 % Bore (B); 0,003% Cuivre (Cu); 0,030% Fer séquestré par DTPA (Fe); 0,025% Manganèse (Mn); 0,0010% Molybdène (Mo); 0,0125% Zinc (Zn).

Transfer of the insecticide [^{14}C] imidacloprid from soil to tomato plants

H. Alsayed · S. Pascal-Lorber · C. Nallanthigal ·
L. Debrauwer · F. Laurent

Received: 27 September 2007 / Accepted: 1 October 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The fate of imidacloprid was investigated in tomato plants during 75 days in soil contaminated by ^{14}C -imidacloprid. Leaves and fruits were separately analysed for total radioactivity and metabolites. Almost 85% of plant radioactivity was translocated to shoots. Radioactivity concentrations decreased from bottom leaves to top leaves. Desnitro-imidacloprid was the main metabolite in leaves. Nevertheless, more than 50% of the leave radioactivity corresponded to imidacloprid. Residue concentrations were similar in all fruits (62.9 ng g^{-1}), irrespective of their position on plant. In fruits more than 85% of the radioactivity was due to imidacloprid. The small fraction of residues translocated to fruits depended on the low xylem flow in fruits.

Keywords Imidacloprid · Tomato fruits · Uptake · Translocation · Metabolism

Introduction

Risk assessment of pesticide residues in plants requires good characterization of the transfer of residues from contaminated environment to edible parts of the plant. Depending on their physicochemical characteristics, xenobiotics are transported from roots to leaves by crude sap via the xylem pathway, or from leaves to the other

organs by elaborated sap via the phloem pathway. Residues can be transferred to the fruits through either of the two pathways. However, the mechanisms by which residues accumulate in fruits have rarely been described. In the transfer models used for risk analysis (Trapp 1995), the phloem pathway is generally privileged, although there are models including the xylem pathway (Fujisawa et al. 2002). As phloem transports few pesticides, the risk of pesticide contamination of fruits by internal pathways generally appears to be low. Nevertheless, it has been demonstrated that a considerable quantity of water could be transported to the fruit via the xylem pathway, particularly in fleshy fruits (Matthews and Shackel 2005). This could thus represent a relatively significant delivery of residues to fruits.

On the other hand, following penetration of the chemical, plants are able to metabolize xenobiotics. Metabolism generally modifies polarity of residues. This change in polarity could also modify the residue distribution in plants by xylem or phloem transport. Imidacloprid, 1-[(6-chloro-3-pyridinyl) methyl]-*N*-nitro-2-imidazolidinimine is representative of the class of chloronicotinyl compounds. It is a systemic insecticide with soil, seed, and foliar uses for the control of sucking insects such as aphids, thrips, whiteflies and soil insects that consume roots (Elbert et al. 1998). Imidacloprid penetrates the plant and moves from the stem to the apex of the plant (acropetal movement). The systemic behavior of imidacloprid has been studied in several crops, especially after seed treatment (Westwood et al. 1998; Nauen et al. 1999; Laurent and Rathahao 2003).

Hence the present study aims at investigating the fate of imidacloprid after soil treatment by ([4,5- ^{14}C] imidazolidine) imidacloprid and the translocation of imidacloprid residues in tomato plants, in particular with fruits at various stages of growth.

H. Alsayed · S. Pascal-Lorber · C. Nallanthigal ·
L. Debrauwer · F. Laurent (✉)
Institut National de la Recherche Agronomique,
UMR1089 Xénobiotiques, 180 ch. de Tournefeuille,
BP3, 31931 Toulouse cedex 9, France
e-mail: flaurent@toulouse.inra.fr

Experimental

Chemicals and synthetic standards

([4,5- ^{14}C] imidazolidine) imidacloprid (specific activity = 26.8 mCi mmol $^{-1}$, radiochemical purity = 99.9% by radio-reverse phase-high performance liquid chromatography, radio RP-HPLC) was purchased from the Institute of Isotopes Co. (Budapest, Hungary). For treatment and analyses, pure non-radiolabeled imidacloprid (99.7%) was obtained from Cluzeau (Bordeaux, France). Solvents used for extractions were obtained from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain).

Soil treatment

Experiment soil constituted homogeneous mixture of humus (muddy-clay soil, dry matter: 65%; organic matter: 12% dry mass; pH 6.2–6.5) (PYT, Ogeux-les-bains, France) and sand (1:1, w/w). Before tomato transplantation, substrata were contaminated by [^{14}C] imidacloprid diluted in water. Substrata were blended in a cement mixer to homogenize contamination then distributed in 1-L pot (1.3 kg/pot). Homogeneity of soil contamination was checked by radioactive count of five samples. The specific radioactivity of imidacloprid was fit to each experiment. For translocation study, each pot contained 4 μCi (148 kBq) and 1 mg a.i. For bioavailability of imidacloprid in the soil, substrata were divided into five lots which were frozen at -80°C until used. For study, a lot was defrosted and divided in three pots. Each 1-L pot contained 0.87 μCi (32 kBq) and 0.333 mg a.i.

Plant material

Tomato seeds (*Lycopersicon esculantum* L. cv. Montfavet 63-sf) were obtained from Institut National de Recherche Agronomique (France). Seeds were individually sown in humus (150 mL plastic pots) and were grown in a climate-controlled cabinet at 25/19°C (day/night) with a 16 h photoperiod and 350 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR.

Translocation study

For experiments, 15-day-old tomato seedlings or plants were then individually transplanted in 1-L pots containing the imidacloprid contaminated substrata. Tomato plants were grown in outdoor conditions (from May to July) under a protection against rainy episode. Water supply was given by drip irrigation to maintain soil moisture about to 65% of

water holding capacity. Tomato plants were randomly harvested at 30, 45, 60, and 75 days after transplantation (four plants at each time). Each plant was cut to roots, individual leaves and individual fruits. Samples were weighted then stored at -20°C until analysis.

Bioavailability of imidacloprid in the soil

Every 15 days, one lot was defrosted and placed in sheltered outdoor conditions. The soil was moistened daily to 40% of humidity capacity. When the fifth lot was defrosted, one 15-day-old tomato seedling was transplanted in each pot. After 15 days, the plants were harvested and the radioactivity in leaves and roots was quantified.

TSCF determination

To determine TSCF (transpiration stream concentration factor), tomato plants were grown in imidacloprid standard soil. After 45 days, roots were cleaned up for soil and dipped into nutrient solution (1 L by plant of 0.5 Hoagland's nutrient solution) containing 147 $\mu\text{Ci/L}$ (5.44 of [^{14}C] imidacloprid and 1 mg of imidacloprid, analytical standard). Some leaves were put in plastic bags containing anhydrous CaCl_2 . Each day, bags were weighed to determine evapotranspiration. Nutrient solution was maintained to the same volume and the same radioactive concentration during three days of experiment. Then, leaves covered with bags were harvested, weighed, desiccated and their radioactivity was determined. Ratio from imidacloprid leaf amount to evapotranspiration amount was calculated to estimate concentrations of imidacloprid in xylem sap. Then TSCF was calculated from the ratio of the estimated concentrations to the imidacloprid nutrient concentration.

Samples analyses

Preparation of plants extracts

Samples were freeze-dried for 72 h and ground with a ball grinder (Bioblock, Illkirch, France) for 2 min. Ground tissues were homogenized in water-acetonitrile mixture (80:20, v/v) and mixed on a vortex shaker for 2 min and stored overnight at -20°C . Pellets were washed twice with the same mixture. After these washings, less than 5% of the total radioactivity was again extractable, whatever be the washing solvent. Extracts and washing solutions were combined, concentrated to dryness on a rotary evaporator with a bath temperature below 35°C , and then analyzed by radio-HPLC. The residual material (pellets), which

consisted of non-extractable residues, was allowed to air-dry at room temperature for 48 h before determining radioactivity.

High-performance liquid chromatography (HPLC)

Metabolite analyses were carried out on a C 18 reverse-phase ProntoSIL (6 μ m) Bischoff column (250 \times 4 mm) with a 1 cm guard cartridge of the same phase in oven at 31°C using a Spectra-Physics P4000 liquid chromatograph equipped with a P1000 Spectra-Physics UV detector set at 270 nm. The flow rate was 1 mL min⁻¹. Radioactivity of column effluent was monitored on-line with a Packard Flo-One A250 β scintillation detector (cell volume, 0.5 mL) using Flo-Scint 2 (Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France) as scintillation counting cocktail (scintillation cocktail ratio, 2 mL scintillation liquid/1 mL HPLC effluent). The mobile phases were composed of solvent A (water/acetonitrile/acetic acid) (96:2:2, v/v/v) and solvent B (water/acetonitrile/acetic acid) (20:78:2, v/v/v), starting with 100% A with a linear gradient to 100% B at 40 min. Under these conditions, standard compound and metabolites were eluted as follows: imidacloprid, 35 min; 4- or 5-hydroxy-imidacloprid, 26 min; olefin (4,5-deshydro-imidacloprid), 24 min; desnitro-imidacloprid (guanidine metabolite), 12 min.

Mass spectrometry analyses

All analyses were carried out using a quadrupole ion-trap mass spectrometer (Finnigan LCQ, Thermo Finnigan, Les Ulis, France) equipped with an electrospray ionisation source operated in the positive-ion mode using the following conditions: needle voltage (5 kV); heated capillary temperature (220°C); capillary voltage (3 V). The analyte solutions in methanol/water (50:50, v/v) mixture were directly introduced into the ESI source at a flow rate of 3 μ L min⁻¹.

MSⁿ identifications were performed on the mass-selected ion in the ion trap mass spectrometer. Ion isolation and collision conditions were optimised separately for each metabolite in order to gain maximal structural information. Helium buffer gas also served as the collision gas for these experiments. All spectra were acquired using Automatic Gain Control.

Determination of radioactivity

Plant parts were freeze-dried for 72 h and then weighed. Afterwards, each sample was frozen at -80°C and ground

with a ball grinder for 5 min. Total radioactivity in the different plant parts was measured after oxidative combustion of two aliquots in an oxidizer (Oxidizer model 307, Packard Co., Downers Grove, IL). The resulting [¹⁴C] carbon dioxide was trapped in a scintillation cocktail (Carbosorb/Permafluor) (7:10, v/v) (Perkin Elmer Life Sciences) and the radioactivity was quantified by liquid scintillation counting in a Packard Tricarb 2200CA scintillation counter.

Data analysis

Data expressed as microgram of equivalent parent compound per gram, are always relative to dry weight (DW). They represent the average of at least four measurements for each experiment and were analyzed for statistical significance by S-Plus test ($P < 0.05$).

Results and discussion

Soil uptake

Absorption and transfer of [¹⁴C] imidacloprid were monitored in tomato plants for a period of 75 days, long enough for certain fruits to reach maturity. In the period up to 60 days, uptake increased and reached 7.9% of the quantity of imidacloprid present in the soil soon after transplantation. Fifteen days later (75 days after transplantation), uptake was slightly lesser (6.9% of the soil quantity). During experiment, the effect of plant uptake was negligible on the quantity of imidacloprid in soil (1 mg imidacloprid/1.3 kg soil). The decrease between 60 and 75 days could be due to a reduction of the soil bioavailability of imidacloprid. Imidacloprid is known to adsorb onto soil particles (Oi 1999) and it could be degraded in soil (Rouchaud et al. 1996) resulting to a relatively short half-life depending on soil characteristics.

To quantify the residue bioavailability in our growth conditions, we measured the amount of residues absorbed by tomato plants transplanted to soils, in which the duration of residence of the contamination varied before. The absorption rate of residues decreased proportionally with the age of the soil contamination (Fig. 1) with a half-life of 63 days. This pseudo half-life was in same order the one reported in literature (Rouchaud et al. 1996). Although here, the plant bioavailability integrated the soil sorption, soil degradation and residue uptake by plants, without distinction between imidacloprid and its degradation products—the structure of compounds taken up from soil by plants was not determined.

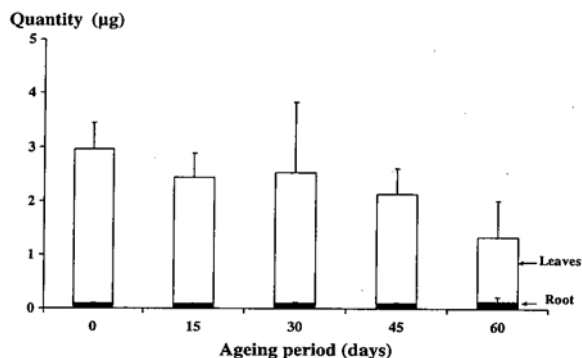


Fig. 1 Decrease in amounts of residues absorbed by tomato plants depending on the length of the ageing period of [^{14}C] imidacloprid in the soil. Fifteen days old seedlings were transferred to [^{14}C] imidacloprid contaminated soil and grown for 15 days at the same time. Black root; white shoot. $n = 3$

Translocation in vegetative parts

More than 85% of radioactivity was translocated to shoots (Fig. 1). In roots, small quantities were detected and no significant difference was observed with respect to the age of the soil contamination. The polarity of imidacloprid ($K_{ow} = 0.57$) and its solubility in water (0.61 g/L) resulted in its limited retention by tissues and no accumulation in roots. Moreover, in tomato plants, imidacloprid TSCF measured under our conditions was 0.702 ± 0.053 . Imidacloprid TSCF calculated from Briggs' equation was 0.430 (Briggs et al. 1982). Thus the measured TSCF in tomato plant was higher than the calculated one and was close to the optimum TSCF about 0.9. Although a weaker K_{ow} than the optimum of about 1.8, determined by Briggs et al. (1982), imidacloprid moved easily through xylem flow and

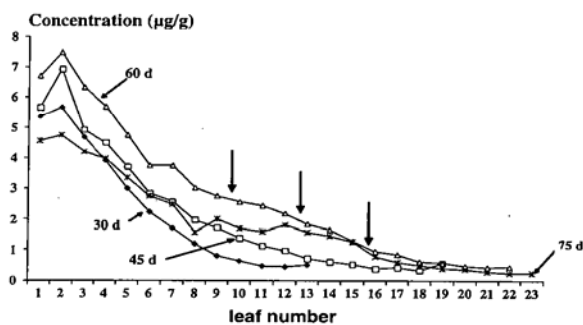


Fig. 2 The concentration of [^{14}C] imidacloprid increased with time until 60 days in the leaves of seedlings transplanted in contaminated soil whereas the concentrations decreased from bottom (leaf 1) to apex. Abscissa numbers indicate position of leaves on plants (1 is the bottom oldest leaf). Vertical arrows indicate position of inflorescences

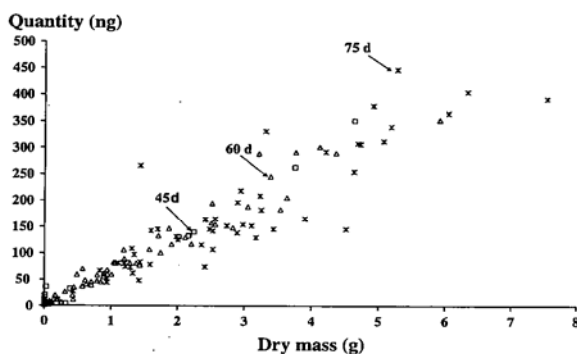


Fig. 3 The quantity of radioactivity in fruits was proportional to the dry mass of the fruit irrespective of the considered branch and the degree of fruit maturity or the time of harvest after the transplantation of tomato seedling in [^{14}C] imidacloprid contaminated soil

could be acropetally transferred to tomato shoots as already shown in other plants (Briggs et al. 1993).

In shoots the concentration decreased exponentially from the leaves number 2 to the top of the shoot (Fig. 2). Concentrations in the first leaves (leaf 1) were always less than in leaf 2. At 30 days, the concentration in the second oldest leaf was equivalent to $5.6 \pm 0.6 \mu\text{g g}^{-1}$ of imidacloprid, while only $0.74 \pm 0.59 \mu\text{g g}^{-1}$ was located in the apex leaf (Fig. 2). Such an acropetal gradient has already been reported and is in agreement with xylem distribution of imidacloprid in plants (Laurent and Rathahao 2003). Until 60 days, imidacloprid concentrations increased in leaves, until a maximum of $7.4 \pm 0.9 \mu\text{g g}^{-1}$.

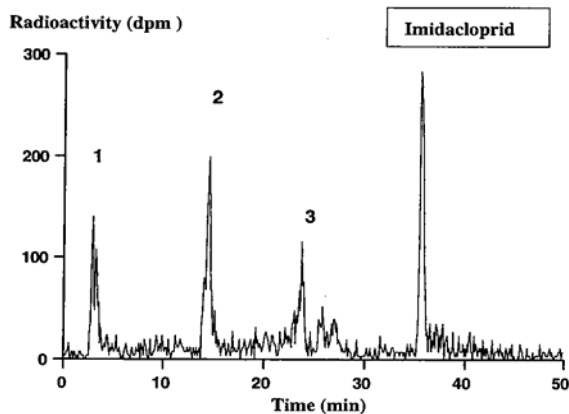
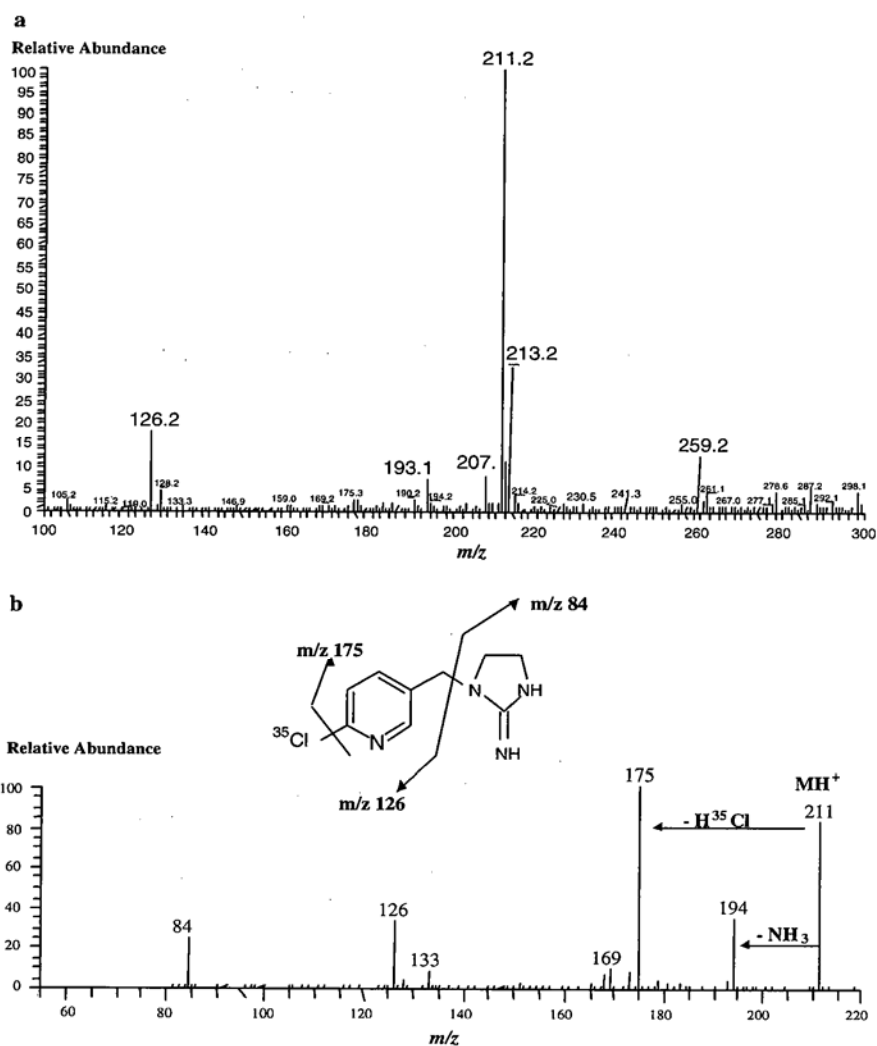


Fig. 4 A typical radio-HPLC chromatogram of an extract of a leaf number 3 showed the metabolism of imidacloprid in tomato plants grown 30 days on soil contaminated with [^{14}C] imidacloprid. Peak 2 was formally identified as desnitro-imidacloprid (see below Fig. 5) and peak 3 was tentatively identified as [4,5-deshydro(imidazolidine) imidacloprid]

Fig. 5 Mass spectra of the desnitro-imidacloprid metabolite (peak 2) extracted from leaves. **a** Mass spectra was MS of quasi molecular ions (m/z 211–213) of desnitro-imidacloprid. **b**, Mass spectra was MS² of quasi-molecular ³⁵Cl isotopic ion of m/z 211. The formula of metabolite is inset with a diagram showing the locations of fragmentation



Translocation in reproductive parts

In fruits, amount of radioactivity was directly proportional to fruit dry mass for the three fruiting branches studied (Fig. 3). This means that the concentration, as imidacloprid residues, inside the fruit was constant and equal to $62.90 \pm 2.41 \text{ ng g}^{-1}$. This was lower than concentrations found in leaves located at the same height on the plant. In contrast to the acropetal gradient in the vegetative part of the plant, the concentration in fruits was independent of the position of the branch of tomatoes on the plant, or the position of the fruit on the branch. In this experiment, fruits were harvested from small green fruits to red ripe fruits. Consequently, the degree of maturity did not affect the

concentration of the residues in fruits. Contrary to leaves, the flow of residues towards the fruit also appears to be constant over time.

Metabolism

In leaves, imidacloprid is the major compound of residues but other peaks were observed in radiochromatograms (Fig. 4). The peak number 2 was tentatively identified by mass spectrometry as the guanidine metabolite (Fig. 5a, b). The peak 3 was not identified by mass spectrometry but coeluted with the olefin standard. The more polar peak was unidentified. Nevertheless, in fruits only one metabolite

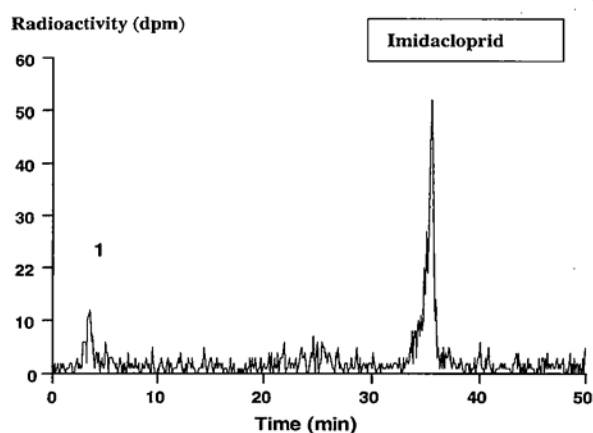


Fig. 6 A typical radio-HPLC chromatogram of an extract from tomato fruits showed weak metabolism of imidacloprid after plants were grown 75 days on soil contaminated with [^{14}C] imidacloprid

was found in small amount along with the unidentified polar peak (Fig. 6), major radioactivity corresponding to imidacloprid. By contrast to our results, Koester (1992) reported only the hydroxy-imidacloprid and olefin metabolites in tomato cell cultures, without detecting the guanidine metabolite, but in these cell cultures, imidacloprid was weakly degraded, less than 3%.

In leaves, evapotranspiration plays a determining role in changes in concentrations (Stein-Donnecke et al. 1992). In contrast to leaves, transpiration of tomato fruits is low in comparison to its weight (Guichard et al. 2005). The flow of xylem is used almost exclusively for fruit filling and it only represents a quarter of the volume of the fruit, the filling remainder being supplied by phloem sap (Kawabata et al. 2005). Consequently, imidacloprid residues accumulation in fruit corresponded to residue amount in that low xylem-sap volume, without a significant accumulation of residues due to evapotranspiration.

Moreover, the accumulation was time-limited in fruits, which were all subjected to the same growth period (about 1 month). This contributed to the lower concentration in fruits than in leaves and to the same concentration in all fruits. So, low accumulation in fruits was not due to the adsorption of molecules in xylem vessel tissues, like suggested by some authors (Trapp 1995). Reduction of the imidacloprid bioavailability over time did not seem to influence fruit concentrations. The resultant reduction of the flow of imidacloprid was probably too low to significantly affect the residue accumulation in fruits growing on the third fruiting branch comparatively to those in fruits of the first branch, despite of the 20-day delay between the two branch appearances.

Conclusion

Owing to the typically xylem-mobile character of imidacloprid, the systemic contamination of tomato fruits resulted from the xylem water entrance in fruits, and the low concentration within fruits was due to the low quantity of water that entered by xylem flow in the tomato fruit. On the other hand, only unchanged imidacloprid was translocated to the fruit although the more polar residues appeared in leaves.

References

- Briggs GG, Bromilow RH, Evans AA, Williams M (1982) Relationship between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pestic Sci* 3:495–504
- Briggs GG, Bromilow RH, Evans AA, Williams M (1993) Relationship between lipophilicity and the distribution of non-ionised chemicals in barley shoots following uptake by the roots. *Pestic Sci* 14:492–500
- Elbert A, Nauen R, Leicht W (1998) Imidacloprid, a novel chloronicotinyl insecticide with biological activity and agricultural importance. In: Ishaaya I, Degheele D (eds) *Insecticides with novel modes of action, mechanism and application*. Springer, Heidelberg, pp 50–74
- Fujisawa T, Ichise K, Fukushima M, Katagi T, Takimoto Y (2002) Improved uptake models of nonionized pesticides to foliage and seed of crops. *J Agric Food Chem* 50:532–537
- Guichard S, Gary C, Leonardi C, Bertin N (2005) Analysis of growth and water relations of tomato fruits in relation to air vapor pressure deficit and plant fruit load. *J Plant Growth Regul* 24:201–213
- Kawabata S, Sasaki H, Sakiyama R (2005) Role of transpiration from fruits in phloem transport and fruit growth in tomato fruits. *Physiol Plant* 124:371–380
- Koester J (1992) Comparative metabolism of [pyridinyl- ^{14}C methyl] imidacloprid in plant cell suspension cultures. *Proc Brighton Crop Prot Conf Pest Diseases* 2:901–906
- Laurent FM, Rathahao E (2003) Distribution of [^{14}C] imidacloprid in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment. *J Agric Food Chem* 51:8005–8010
- Matthews MA, Shackel KA (2005) Growth and water transport in fleshy fruit. In: Holbrook NM, Zwieniecki MA (eds) *Vascular transport in plants*. Elsevier, Boston, pp 181–197
- Nauen R, Reckmann U, Armbrorst S, Stupp HP, Elbert A (1999) Whitefly-active metabolites of imidacloprid: biological efficacy and translocation in cotton plants. *Pestic Sci* 55:265–271
- Oi M (1999) Time-dependent sorption of imidacloprid in two different soils. *J Agric Food Chem* 47:327–332
- Rouchaud J, Gustin F, Wauters A (1996) Imidacloprid insecticide soil metabolism in sugar beet field crops. *Pestic Sci* 56:29–36
- Stein-Donnecke U, Führ F, Wienecke J, Hartwig J, Leicht W (1992) Influence of soil moisture on the formation of dressing zones and uptake of imidacloprid after seed treatment of winter wheat. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 45:327–368
- Trapp S, McFarlane JC (eds) (1995) *Plant contamination*. CRC, Boca Raton, pp 107–151
- Westwood F, Bean KM, Dewar AM, Bromilow RH, Chamberlain K (1998) Movement and persistence of [^{14}C] imidacloprid in sugar-beet plants following application to pelleted sugar-beet seed. *Pestic Sci* 52:97–103